Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut
Abteilung: Biochemie der Pflanzen
der Georg-August-Universität Göttingen

UNTERSUCHUNGEN ZUR BIOSYNTHESE DER PHOSPHONOAMINOSÄUREN IN TETRAHYMENA PYRIFORMIS

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von

FRIEDBERND GEIKE
aus Bremerhaven

Göttingen 1967

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544311_0055

Fotodruck: Andreas FUNKE, Offsetdruck
34 Göttingen, Wendenstraße 5b

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut
Abteilung: Biochemie der Pflanzen
der Georg-August-Universität Göttingen

UNTERSUCHUNGEN ZUR BIOSYNTHESE DER PHOSPHONOAMINOSÄUREN IN TETRAHYMENA PYRIFORMIS

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von

FRIEDBERND GEIKE
aus Bremerhaven

Göttingen 1967

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

D 7

Referent: Professor Dr. A. Trebst
Korreferent: Professor Dr. A. Pirson

Tag der mündlichen Prüfung: 26. Oktober 1967

Die vorliegende Arbeit wurde im Pflanzenphysiologischen Institut, Abteilung Biochemie der Pflanzen, der Universität Göttingen in der Zeit von Dezember 1965 bis April 1967 ausgeführt.

Herrn Prof. Dr. Trebst
danke ich herzlich für die Förderung dieser Arbeit durch Anleitung und Diskussion.

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung 1

II. Ergebnisse 4

1. Problemstellung 4

2. Voruntersuchungen zur Ausarbeitung von Standardbedingungen für die Biosynthese, Isolierung sowie den Abbau von AEP 6

2,1. Untersuchungen über das Wachstum von Tetrahymena pyriformis bei Veränderung des Standardmediums ... 6

2,2. Ausarbeitung der Versuchsmethodik zur Isolierung von AEP und APP 10

2,3. Vorversuche zum chemischen Abbau von 2-AEP 16

3. Untersuchungen zur Biosynthese von AEP mit markierten Substanzen am intakten Organismus 18

3,1. Untersuchungen mit ^{32}Phosphat 18

3,2. Untersuchungen mit positionsmarkierten Glucosen . 25

3,3. Untersuchungen mit positionsmarkiertem Serin und Äthanolamin 32

4. Chemischer Abbau der aus positionsmarkierten Glucosen entstandenen AEP 34

5. Untersuchungen zur Biosynthese von AEP mit zellfreien Präparationen von Tetrahymena pyriformis . 41

5,1. Allgemeines 41

5,2. Untersuchungen zum Glucoseeinbau in AEP mit zellfreien Präparationen 41

5,3. Untersuchungen zum Serineinbau in AEP mit zellfreien Präparationen 43

5,4. Untersuchungen zum Äthanolamineinbau in AEP durch zellfreie Präparationen 45

III. Diskussion 48

IV. Methodik 58

V. Zusammenfassung 65

VI. Literaturverzeichnis 67

I. Einleitung

Organische Phosphonoverbindungen wurden in biologischem Material erst relativ spät entdeckt. Im Jahre 1959 fanden Horiguchi und Kandatsu[1] in Protozoen des Schafpansens eine bisher unbekannte Ninhydrin-positive Substanz, die sie als 2-Aminoäthylphosphonsäure (AEP) identifizieren konnten. Die Verbindung besitzt wie alle Phosphonoverbindungen die äußerst stabile kovalente P-C-Bindung, die sich im Gegensatz zu allen anderen in Organismen vorkommenden organischen Phosphorverbindungen wie Phosphatestern, Säureanhydriden etc. selbst durch mehrtägiges Erhitzen in 6 N HCl nicht spalten läßt.

$$\begin{array}{l} CH_2 - NH_2 \\ | \\ CH_2 \\ | \\ PO_3H_2 \end{array}$$

Aminoäthylphosphonsäure
(AEP)

Nach diesem ersten Auffinden einer Phosphonoverbindung in biologischem Material wurde inzwischen mehrfach über die Isolierung von AEP aus Vertretern der verschiedensten Stämme des Tierreichs berichtet[2-11]. So konnte man in den letzten Jahren AEP aus dem holotrichen Ciliaten Tetrahymena[2-4], aus äthanolischen Extrakten der Seeanemonen Anthopleura elegantissima[4-6] und Zoanthus sociatus[4], aus unlöslichen Proteinfraktionen von Metridium dianthus[7], aus den Molluscen Corbicula sandai und fünf weiteren Muschelarten[8], aus Haliotis midae[9] und schließlich sogar aus Rinderhirnen[10] und aus Ziegenleber[11] isolieren und reinigen.

Neben AEP konnten einige weitere Vertreter dieser völlig neuen Substanzklasse gefunden und identifiziert werden. So wurden alle drei N-Methylderivate von AEP aus der Seeanemone Anthopleura xanthogrammica[12] und 2-Amino-3-Phosphono-Propionsäure (APP) aus Tetrahymena und Zoanthus sociatus[4] isoliert und charakterisiert. Vergleichende Untersuchungen bei Coelenteraten führten zum Nachweis von acht weiteren bisher noch

unbekannten Phosphonoverbindungen, von denen fünf Ninhydrin-positiv waren[4].

Nach diesen bisher vorliegenden Ergebnissen war es also möglich, Phosphonoverbindungen bei Vertretern von vier Tierstämmen,den Protozoen,Coelenteraten,Molluscen und Vertebraten nachzuweisen und zu isolieren.

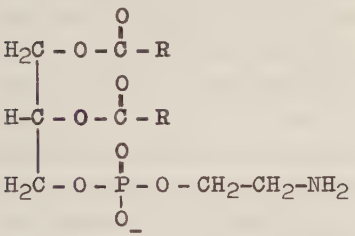
Obwohl Phosphonoverbindungen schon relativ lange in der Chemie durch zahlreiche Synthesen,von denen hier nur die der Aminophosphonsäuren zitiert werden sollen[13-21],bekannt sind und vor allem in der Sowjetunion praktische Anwendung unter anderem bei Helminthiose[22] sowie als Insektizide[23] und Herbizide[24] fanden, gewann diese Verbindungsklasse erst durch ihr Vorkommen in biologischem Material zunehmende Beachtung. Auf Grund ihres Verhaltens und ihrer chemischen Struktur hat man diese Phosphonoaminosäuren in erster Linie als Analoga von natürlich vorkommenden Aminosäuren betrachtet[21]. Formal kann man von den natürlich vorkommenden Phosphonoaminosäuren AEP als Analogon von ß-Alanin und APP als solches von Asparaginsäure ansehen,doch scheint diese Analogie zu den Aminosäuren zumindest für AEP irreführend zu sein.

Asparagin-säure	APP	AEP	Äthanolamin-Phosphat	ß-Alanin
$COOH$ $CH-NH_2$ CH_2 $COOH$	$COOH$ $CH-NH_2$ CH_2 PO_3H_2	CH_2-NH_2 CH_2 PO_3H_2	CH_2-NH_2 CH_2 O PO_3H_2	CH_2-NH_2 CH_2 $COOH$

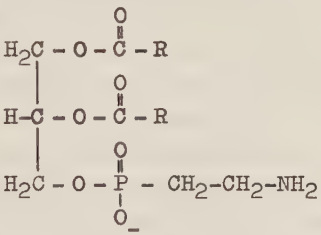
Da AEP in der Hauptsache in Phospholipidfraktionen vorkommt, ist die Analogie zu Äthanolamin-Phosphat wahrscheinlich richtiger. Zwar findet sie sich auch in größeren Mengen in Proteinkomplexen, kann daraus jedoch nicht durch Behandlung mit proteolytischen Enzymen freigesetzt werden[3].Es dürfte sich deshalb wahrscheinlich um Lipoproteine der Membranen handeln[3].

Die bisherigen Ergebnisse[3-6,8,9] haben gezeigt,daß AEP in Lipiden anzutreffen ist, deren genaue Strukturaufklärung zum Teil gelang.So erwies sich das aus Anthopleura elegantissima

isolierte Phosphonolipid als Ceramid - Aminoäthylphosphonat[6] und das aus Corbicula sandai als Sphingolipid[8]. Ein weiterer Hinweis dafür,daß die Analogie zu ß-Alanin für AEP nicht zuzutreffen scheint,dürften die Ergebnisse von Kittredge et al.[5] sowie von Chou und Scherbaum[25] sein,die auf das Vorhandensein eines Glycerinesters von AEP hindeuten. Auf Grund dieser Daten erscheint die Annahme einer Analogie zwischen AEP und Äthanolamin - Phosphat gerechtfertigter als die zwischen AEP und einer Aminosäure. Dies wird besonders durch Versuche von Liang und Rosenberg[26] gestützt,denen die Biosynthese des Phosphonosäure-Analogons von Cephalin mit zellfreien Präparationen von Tetrahymena pyriformis gelang,wobei die Reaktionssequenz vollkommen jener des Äthanolamin - Phosphats zum Cephalin entspricht.Eine weitere Bestätigung dieser Annahme dürf-



Cephalin



Phosphono-Cephalin

te der Einbau gefütterter AEP in Phospholipide von Musca domestica[27] sein. Dieser Einbau ist allerdings sehr unspezifisch,da Musca domestica lipidgebundenes Cholin und Äthanolamin auch durch 2-Aminopropan-1-ol,3-Aminopropan-1-ol,1-Aminopropan-2-ol sowie 2-Aminobutan-1-ol ersetzen kann[28,29],jedoch kein Enzym zur Synthese von AEP sowie der genannten Verbindungen besitzt. Der gleiche unspezifische Einbau von verfütterter AEP in die Leber - Lipide von Ratten wurde von Kandatsu et al.[30] gefunden, und auf der gleichen Ursache dürfte das Vorkommen von AEP in Leber-Lipiden von Ziegen beruhen,in deren Pansen AEP-produzierende Ciliaten leben[11].

II. Ergebnisse

1. Problemstellung

AEP ist bisher aus einer Vielzahl von Organismen isoliert worden. Trotz der weiten Verbreitung dieser Verbindung in einigen Tierstämmen ist über die Biosynthese dieser Substanz bisher nur wenig bekannt. Kinetische Untersuchungen mit ^{32}P-markiertem Phosphat an Tetrahymena zeigten einen sehr schnellen Einbau in Lipid-gebundene und einen langsamen in freie AEP[3]. Weitere eingehendere Untersuchungen[31] deuten darauf hin, daß freie AEP in Tetrahymena nicht der Vorläufer der Lipid-gebundenen AEP ist, da diese nach kurzen Inkubationszeiten eine wesentlich höhere spezifische Aktivität erreicht als freie AEP, so daß die Biosynthese wahrscheinlich an Lipiden abläuft. Ob die freie AEP sekundär aus den Lipiden freigesetzt wird oder über einen zweiten Biosyntheseweg durch Decarboxylierung aus APP entsteht, die nach Ergebnissen von Kittredge und Hughes[4] ebenfalls eine wesentlich niedrigere spezifische Aktivität als AEP besitzt, ist nicht bekannt. Nach den vorliegenden Daten[3] ist ebenfalls nicht eindeutig zu entscheiden, ob die freie Phosphonosäure in Proteine eingebaut wird, oder eine gleichzeitige de-novo-Synthese an Lipoproteinen erfolgt. Diese an Hand von Kinetikuntersuchungen mit ^{32}P-markiertem Phosphat an Tetrahymena gewonnenen Ergebnisse machen zwar wahrscheinlich, daß die Biosynthese an Lipidvorläufern erfolgt, lassen den eigentlichen Biosyntheseweg jedoch völlig im Dunkeln, da man auf diese Weise nur die Verbindungen mit bereits gebildeter P-C-Bindung erfaßt, die unmittelbaren Vorläufer sowie die gesamte Synthesekette jedoch unbekannt bleiben. Vor allem die Herkunft des C-Gerüstes ist auf diese Weise keiner Untersuchung zugänglich.

Auf Grund der beschriebenen Kinetikuntersuchungen von Rosenberg[3], der Eigenschaften von Phospholipiden, Ribonucleinsäuren und geeigneter Modellverbindungen sowie anderer Daten, die zeigen, daß Lipid-gebundene AEP zusammen mit den Phospholipiden vorkommt und eng mit diesen verwandt ist[5,6], wurden

von Segal[32] theoretische Überlegungen zum möglichen Biosyntheseweg der AEP angestellt. Segal diskutiert hauptsächlich zwei Biosynthesewege, doch kommt er zu der Überzeugung, daß eine Biosynthese über Lipidvorstufen am wahrscheinlichsten ist. Eine experimentelle Bestätigung der Theorie, wonach die AEP - Synthese durch ein intramolekulares Rearrangement von Phosphatidyläthanolamin erfolgt, wurde bisher jedoch nicht bekannt.

Es war daher Aufgabe vorliegender Arbeit, mit Hilfe von ^{14}C-markierten Vorläufern die Biosynthese von AEP bezüglich der Herkunft des C-Gerüstes zu untersuchen. Da der unmittelbare Vorläufer dieser Verbindung unbekannt ist, sollte zunächst der Einbau von markierter Glucose am intakten Organismus untersucht werden, da diese als Ausgangssubstanz für die meisten Biosyntheseleistungen der Zelle auch für AEP Bausteine bereitstellen dürfte.

Da Tetrahymena jedoch auf Glucose wächst, ergab sich zunächst das Problem, Bedingungen auszuarbeiten, bei denen einerseits noch ein ausreichendes Wachstum gewährleistet ist, andererseits aber zu große Radioaktivitätsverdünnungen vermieden werden. Dieses Problem stellt sich umso dringender, da Tetrahymena nur während des Zellwachstums AEP synthetisiert, obwohl in der stationären Phase noch große Mengen Orthophosphat in eine Esterbindung überführt werden[3].

Erst nachdem im in-vivo-System ein Einbau von Glucose in AEP gelungen ist und erste Hinweise über den Syntheseweg vorliegen, besteht die Möglichkeit, durch Einsetzen weiterer potentieller Vorläufer die Synthesekette Schritt für Schritt aufzuklären. Fütterungsversuche am intakten Organismus werden jedoch nicht immer zum Ziele führen, da nicht alle Substanzen aufgenommen werden und selbst bei Aufnahme eines gefütterten Vorläufers noch nicht sicher ist, daß er zur Synthese von AEP herangezogen wird, da genügend Fälle von Compartmentierungen bestimmter Syntheseketten bekannt sind, bei denen nur die Anfangsglieder in die Compartimente gelangen, potentielle Vorläufer jedoch nur in die Zellpools aufgenommen und von dort in den allgemeinen Stoffwechsel eingeschleust werden[33].

Um das Problem der Nichtaufnahme von Substanzen sowie der

Compartmentierung von Syntheseketten auszuschalten, soll im zweiten Teil dieser Arbeit versucht werden, in einem Homogenat die Synthese von AEP zu erreichen und spezifische Vorläufer einzubauen. Obwohl durch verschiedene freiwerdende Hydrolasen auch hier nur eine beschränkte Aussage über die Synthese möglich ist, sind diese Arbeiten dennoch für spätere Untersuchungen mit gereinigten Enzymen unumgänglich.

2. Voruntersuchungen zur Ausarbeitung von Standardbedingungen für die Biosynthese, Isolierung sowie den Abbau von AEP.

2,1. Untersuchungen über das Wachstum von Tetrahymena pyriformis bei Veränderung des Standardmediums.

Die Wachstumsbedingungen für Tetrahymena pyriformis sind in zahlreichen Arbeiten eingehend untersucht worden (zusammenfassende Literatur siehe 34), und alle beschriebenen Kulturmedien, die für diese Arbeit von Interesse waren, stimmten darin überein, daß sie relativ viel Glucose enthielten, was zu einer sehr starken Verdünnung von zugesetzter markierter Glucose führen würde und somit nach Möglichkeit zu vermeiden war. Die Vorarbeiten für die Biosyntheseversuche mit markierter Glucose konzentrierten sich daher vor allem darauf, den von Kittredge und Hughes[4] übernommenen Standardansatz durch Variieren der Mediumszusammensetzung unseren Bedürfnissen anzupassen.

Da anzunehmen war, daß ein Weglassen oder eine Verminderung der Glucosegabe im Medium es nötig machen würde, dem Organismus andere Kohlenstoffquellen für den Energie- und Baustoffwechsel zur Verfügung zu stellen, wurden vor allem Substanzen als Ersatzsubstrate ausgetestet, die mit dem Krebscyclus in enger Beziehung stehen, der die Zelle sowohl mit Energie als auch mit wichtigen Synthesebausteinen versorgt. Die Abhängigkeit des Wachstums der Tetrahymenakulturen von den angebotenen Glucosemengen sowie den übrigen Substraten wird in Ta-

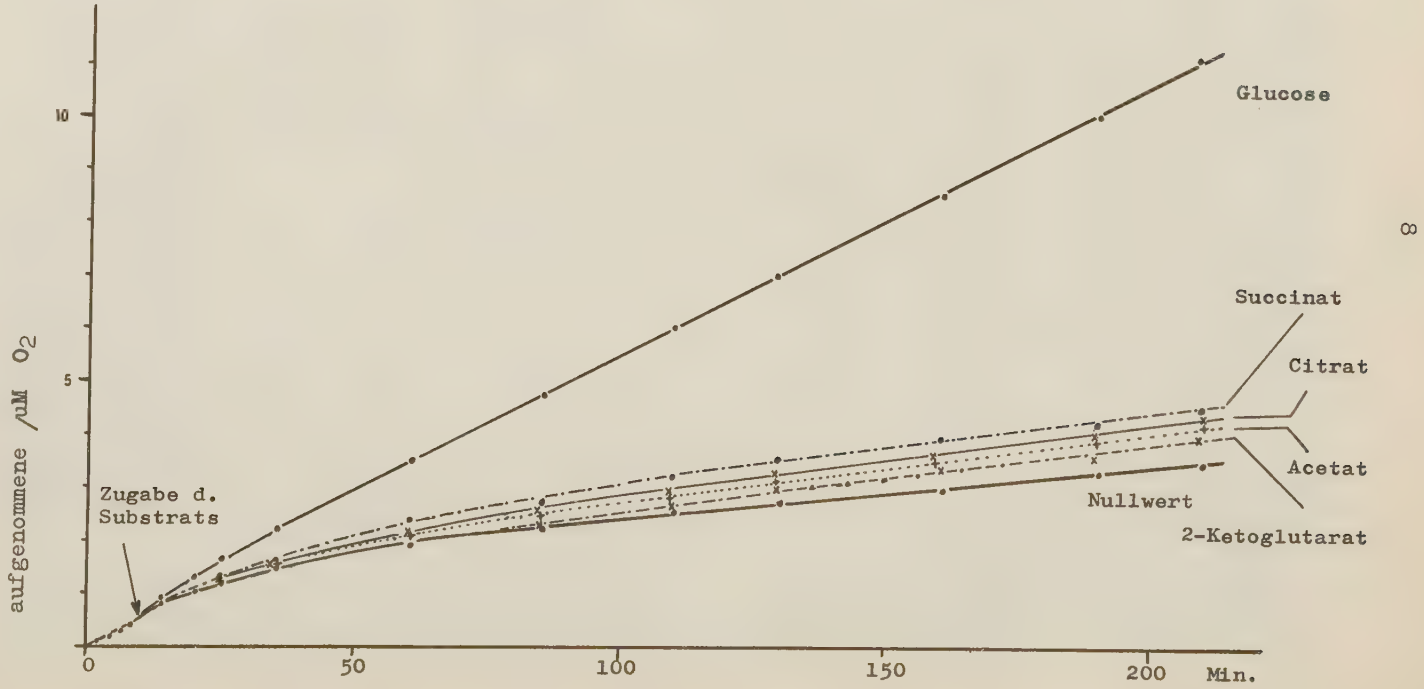
belle 1 in Form der erzielten Trockengewichte nach 48 Stunden Inkubation wiedergegeben.

Die Ergebnisse zeigen eindeutig, daß Glucose im Medium unter den angewandten Kulturbedingungen praktisch durch kein anderes Substrat ersetzt werden kann; denn die Trockengewichtsproduktion erniedrigt sich in den glucosefreien Ansätzen trotz Zusatz anderer Substrate, wie Tabelle 1 zeigt, je nach Zusammensetzung des Mediums auf 6, 9 bzw. 25 % der Normalkultur. Eine Verminderung der Glucosegabe auf 25 % des Standardgehaltes hat jedoch nur einen Abfall der Trockengewichtsproduktion auf 68,5 % dessen der Normalkultur zur Folge, und ein nochmaliger Glucosezusatz der gleichen Menge nach 36-stündiger Inkubation bewirkt, wie aus Tabelle 1 -Ansatz 3 - hervorgeht, nur noch eine relativ geringe weitere Steigerung auf 79,1 %. Ein Zusatz von Succinat oder Acetat zum Medium zeigt keinerlei positiven Effekt auf das Wachstum der Kulturen; ja man könnte beinahe schon von einer leichten Hemmung

Kultur-Nr. / Mediumsbestandt.	1	2	3	4	5	6	7
Proteose-Pepton	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	2,0
Hefe - Extrakt	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Glucose	0,42	0,1	0,1 + 0,1	0,1	—	—	—
Succinat	—	—	—	0,3	0,5	—	—
Na-Acetat	—	—	—	—	—	1,0	—
Trockengewicht nach 48 Stunden	169,6	116,0	133,8	107,4	15,4	1o,2	42,9
Prozent der Normalkultur		68,5	79,1	63,3	9,1	6,0	25,4

Tabelle 1. Trockengewichtsproduktion von Tetrahymena pyriformis nach Wachstum mit verschiedenen C-Quellen. Die Kulturen wurden in 50 ml Medium obiger Zusammensetzung in 100-ml-Erlenmeyerkolben unter Schütteln bei 37°C bebrütet. Mediumsbestandteile sind in g, Trockengewichte in mg angegeben.

Abb. 1. Sauerstoffaufnahme durch glucoseverarmte Tetrahymena-Suspensionen bei Angebot verschiedener Substrate. Eine 48 h alte Normalkultur wird 10 Min. bei 1.000 g zentrifugiert, mit $2 \cdot 10^{-3}$ M Phosphatpuffer p_H 6,5 gewaschen und im gleichen Puffer unter Zusatz von 0,5 % Hefe-Extrakt aufgenommen und unter Schütteln bei 37°C in Warburg-Gefäßen mit 10 µM des jeweiligen Substrats inkubiert.



sprechen, wie ein Vergleich zwischen Ansatz 2 und 4 (Tab. 1) zeigt, und auch eine Erhöhung der Proteose-Pepton-Konzentration bringt keine nennenswerte Stimulierung der Trockengewichtsproduktion durch die Kulturen.

Die durch die Bestimmung des Trockengewichts als Maß für das Wachstum erhaltenen Ergebnisse werden durch Versuche, in denen die Sauerstoffaufnahme von Tetrahymenasuspensionen in Abhängigkeit vom angebotenen Substrat bestimmt wurde, ergänzt und bestätigt (siehe Abb. 1). Es zeigte sich, daß Substanzen des Krebscyclus sowie Acetat zumindest in bescheidenem Umfange aufgenommen und veratmet werden, da die Sauerstoffaufnahmekurven deutlich höher als bei jener der endogenen Atmung liegen.

Obgleich es sich bei den Suspensionen um Zellen einer gealterten Kultur handelt, wie man sie leicht durch verminderte Glucosegaben während der Anzucht hervorrufen kann und wie sie auch bei den späteren radioaktiven Versuchen verwandt werden, ist die Sauerstoffaufnahme bei dem Glucoseansatz deutlich gegenüber jenen mit den Ersatzsubstraten erhöht, obwohl Zellen einer solchen Kultur einen Abfall der Glucoseaufnahmerate von $2 \cdot 10^{-7}$ mg / Zelle / h um das Zehnfache auf $2 \cdot 10^{-8}$ mg / Zelle / h zeigen[35]. Besonders hervorzuheben ist der lineare Verlauf der O_2-Aufnahme nach einer mehr oder weniger kurzen Übergangsperiode, in der die O_2-Aufnahme leicht erhöht ist, bei allen angebotenen Substraten (Abb. 1).

Aus den Werten der Tabelle 1 sowie aus Abb. 1 ergibt sich, daß zur Aufrechterhaltung eines ausreichenden Wachstums unbedingt Glucose nötig ist, andere Substanzen als Substrate hingegen völlig unwirksam sind. Die Arbeiten von Rosenberg[3] haben aber gezeigt, daß AEP nur während des Wachstums der Kulturen von Tetrahymena synthetisiert wird. Ein Vergleich zwischen den Ansätzen 1 und 2 der Tabelle 1 eröffnet demnach einen gangbaren Kompromiß; denn bei dieser verminderten Glucosegabe wird ein noch ausreichendes Wachstum der Kulturen erzielt, während sich die Verdünnung der markierten Glucose in erträglichen Grenzen hält. Auf der Basis dieser Ergebnisse konnten somit die späteren Untersuchungen zur Biosynthese von AEP mit markierter Glucose durchgeführt werden.

Für die Untersuchungen zur Biosynthese von AEP mit radioaktiven Ausgangssubstanzen wurden die Kulturen daher zunächst 36 Stunden in 300 ml Medium, das 6,0 g Proteose-Pepton, 1,5 g Hefe-Extrakt und 0,6 g Glucose enthielt, bei 37°C unter ständigem mäßigen Rühren mit einem Magnetrührer in einem 1-Ltr.-Erlenmeyerkolben angezogen. Danach wurden die Zellen unter sterilen Bedingungen zentrifugiert und in 300 ml neuem Medium

	Standardansatz	Anzucht für nachfolgende markierte Versuche	Inkubation der Versuche mit markiertem Substrat
Proteose-Pepton	6,0	6,0	2,0
Hefe - Extrakt	1,5	1,5	0,3
Glucose	2,5	0,6	0,1
Inkubationsdauer in h	48	36	10

Tabelle 2. Zusammensetzung der verwendeten Inkubationsmedien für Tetrahymena pyriformis sowie die Inkubationsdauer.

mit 2,0 g Proteose-Pepton, 0,3 g Hefe-Extrakt und 0,1 g Glucose sowie dem radioaktiven Substrat (^{32}P-Phosphat, ^{14}C-Glucose, -Serin oder -Äthanolamin) 10 Stunden nachinkubiert. Die Mediumszusammensetzung sowie die Inkubationszeiten sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

2,2. Ausarbeitung der Versuchsmethodik zur Isolierung von AEP und APP.

Das Vorhandensein der stabilen kovalenten P-C-Bindung erleichtert bei Anwendung von ^{32}P-markiertem Phosphat die Ausarbeitung einer Isolierungsmethode sowie das Auffinden von weiteren Phosphonoverbindungen außerordentlich; denn durch eine drastische Hydrolyse wird bereits eine Vorreinigung er-

reicht, da alle Phosphorverbindungen mit Ausnahme der Phosphonosäuren hydrolysiert werden, so daß alle ^{32}P-markierten Verbindungen, die sich anders als Orthophosphat verhalten, sehr wahrscheinlich Phosphonoverbindungen sein müssen, die mittels geeigneter Verfahren vom Phosphat abgetrennt werden können.

Für die Isolierung und Reinigung der AEP aus Tetrahymena-Ansätzen wurde folgender Weg beschritten:

1. 24-stündige Hydrolyse mit 6 N HCl bei 110°C.
2. Vorfraktionierung des Hydrolysats an einer Dowex-50-H^+-Säule.
3. Fraktionierung an einer Dowex-1-Ac-Säule.
4. Mehrfache Umkristallisation mit synthetischer Träger-AEP.

Die bisher beschriebenen Isolierungsmethoden für AEP unterscheiden sich in der Regel nur im Detail voneinander, so daß zur Ausarbeitung einer geeigneten Standardmethode auf bereits vorhandene Methoden zurückgegriffen werden konnte. Für die Reinigung von AEP mit Hilfe der Säulenchromatographie an Ionenaustauschern hat sich in diesem Falle vor allem die modifizierte kombinierte Anwendung zweier bekannter Verfahren[1,4] bewährt.

Die im folgenden Abschnitt beschriebene Isolierungsmethode wurde mit ^{32}Phosphat ausgearbeitet, da bei Anwendung von ^{32}P-markiertem Phosphat eine Zuordnung der einzelnen Fraktionen außerordentlich erleichtert wird.

Die Zellen werden nach der Inkubation mit dem radioaktiven Substrat 15 Minuten bei 2.000 g zentrifugiert und ohne weitere Behandlung in etwa 250 ml 6 N HCl suspendiert und 24 Stunden bei 110°C am Rückfluß hydrolysiert. Zur Entfernung der HCl wird mehrfach am Rotationsverdampfer bis nahe zur Trockne eingedampft und jeweils mit Wasser aufgenommen. Zur Entfernung der verkohlten Reste wird dann filtriert, kräftig nachgewaschen und schließlich am Rotationsverdampfer bei 40°C zur Trockne eingedampft. Anschließend wird das Hydrolysat in 10 ml 1 N Ameisensäure aufgenommen, auf eine neutralgewaschene Dowex-50-H-Säule (1 x 25 cm) aufgesetzt und zweimal mit je 5 ml 1 N Ameisensäure nachgewaschen. Danach wird zunächst mit

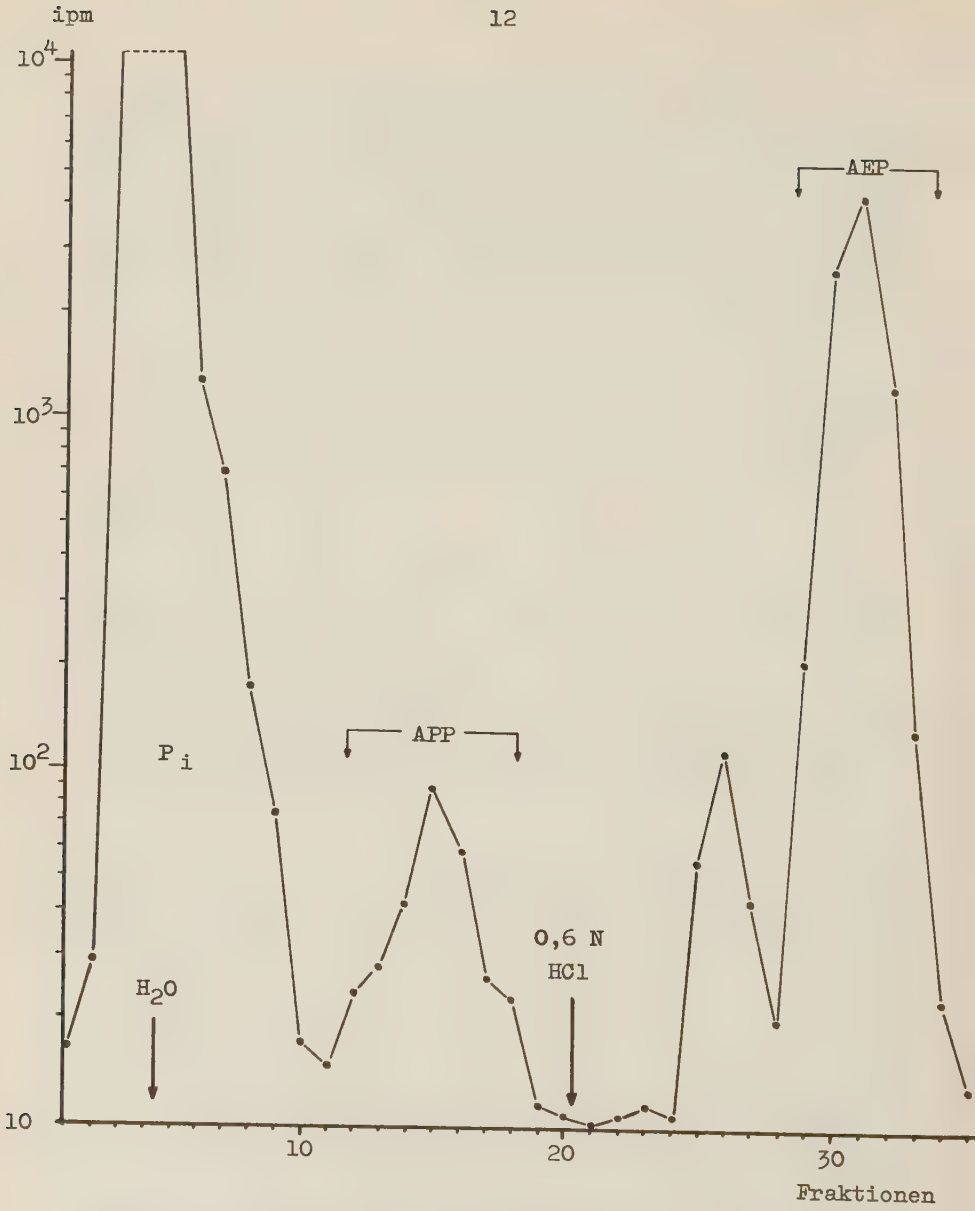


Abb.2 Elutionsdiagramm der ^{32}P-markierten Verbindungen des Hydrolysats an einer Dowex-50-H^+-Ionenaustauscher-Säule.

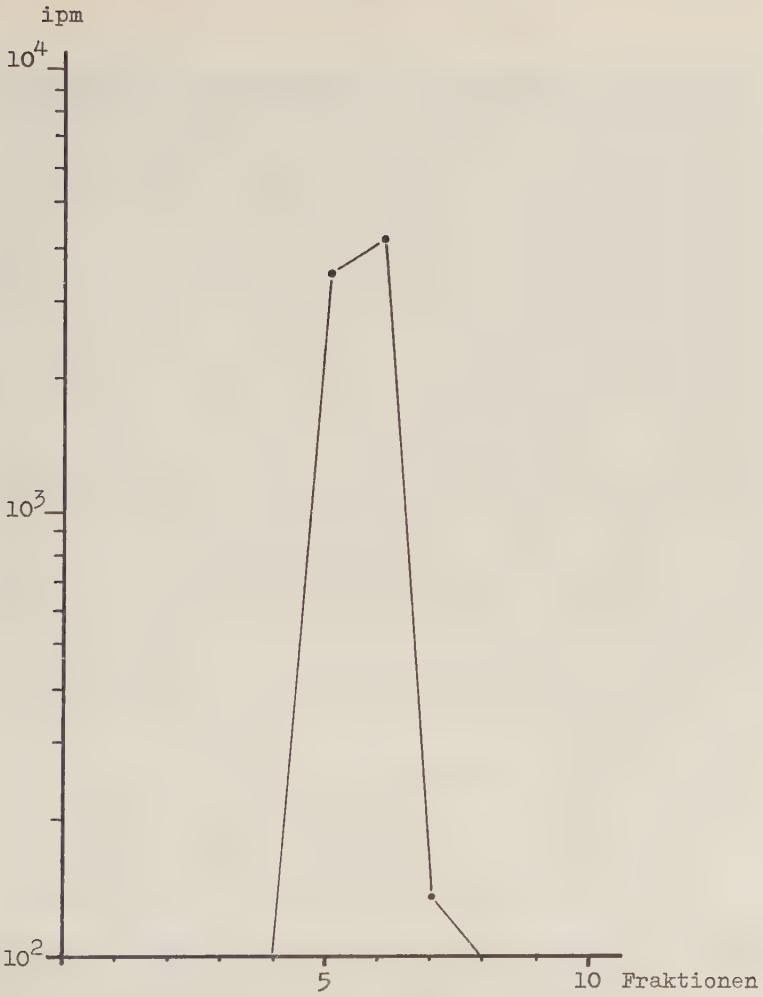


Abb. 3 Elutionsdiagramm von radioaktiver ^{32}P-AEP an einer Dowex-1-Ac-Ionenaustauscher-Säule (Rechromatographie der Fraktionen 29 - 33 der Dowex-50-Chromatographie).

Wasser eluiert.5-ml-Fraktionen werden vom Augenblick des Aufsetzens des Hydrolysats an gesammelt.Ab Fraktion 21 wird das Wasser im Vorratsgefäß durch 0,6 N HCl ersetzt,wodurch es gelingt, AEP in einem scharfen Peak von der Säule zu waschen,

wie das Elutionsschema in Abb. 2 zeigt. Die Fraktionen 29-33, in denen sich die AEP befindet, werden vereinigt, am Rotationsverdampfer zur Trockne eingedampft, in 5 ml entgastem Wasser aufgenommen, auf eine mit entgastem Wasser neutralgewaschene Dowex-1-Ac-Säule (1 x 32 cm) aufgesetzt und zweimal mit je 5 ml entgastem Wasser eingewaschen. Eluiert wird mit 10^{-3} N Essigsäure, und auch hier werden vom Aufsetzen der Substanz an 5-ml-Fraktionen gesammelt. Das Elutionsschema in Abb. 3 zeigt, daß auch in diesem Falle die Substanz in einem wohldefinierten Peak von der Säule kommt. Die in Frage kommenden Fraktionen 5 - 7 werden vereinigt, am Rotationsverdampfer zur Trockne eingedampft, mit wenig Wasser aufgenommen und nach Zusatz von reiner Träger-AEP bis zur konstanten spezifischen Aktivität aus 60 %igem Äthanol umkristallisiert. Da alle anderen Aminosäuren, die in diesen Fraktionen als Verunreinigungen vorliegen, noch bei 80 % Äthanol in Lösung bleiben[36], führt diese Umkristallisation schnell zu einer reinen AEP (siehe auch Tab. 5, Seite 22).

Laufmittel Substanz	A	B	C
AEP	0,22	0,31	0,62
APP	0,08	0,29	0,605

Tabelle 3. Rf-Werte der beiden bisher aus Tetrahymena isolierten Phosphonosäuren in verschiedenen Laufmitteln. A) Phenol - Wasser (80 : 20)
B) Butanol-Eisessig-Wasser (52 : 14 : 35)
C) t - Butanol-Methyläthylketon-Ameisensäure - Wasser (10 : 5 : 1 : 10)

Die Identifizierung und laufende Überprüfung der auftretenden radioaktiven Verbindungen erfolgte mittels ein- oder zweidimensionaler Papierchromatographie auf Schleicher&Schüll Papier 2040 B unter Cochromatographie mit authentischen Substanzen in drei verschiedenen Laufmitteln. Die R_f-Werte der

beiden bisher aus Tetrahymena isolierten und identifizierten Phosphonoaminosäuren in den verschiedenen Systemen sind in Tabelle 3 zusammengefaßt.

Aus dem in Abb. 2 wiedergegebenen Elutionsdiagramm ist zu ersehen, daß sich Phosphat über mehrere Fraktionen nach dem Maximum hinzieht, so daß die Möglichkeit einer Verunreinigung der APP durch Phosphatreste nicht ohne weiteres auszuschließen ist. Während aber AEP sowieso weiteren Aufarbeitungen unterworfen werden mußte, zeigten papierchromatographische Analysen, daß die Trennung am Kationenaustauscher bereits für eine saubere Isolierung von APP ausreicht. Die in Frage kommenden Fraktionen zeigen nach Vereinigung und Einengen am Rotationsverdampfer bei 30°C auf dem Chromatogramm nur einen einzigen Fleck, der mit der Ninhydrinanfärbung synthetischer APP übereinstimmt. Wie Abb. 4 eindeutig zeigt, bleibt Orthophosphat in Phenol - Wasser (80 : 20) praktisch am Start zurück, während die fragliche Substanz im Dünnschicht-Scanner nur einen einzigen radioaktiven Peak liefert, der mit der Ninhydrinanfärbung der cochromatographierten synthetischen APP

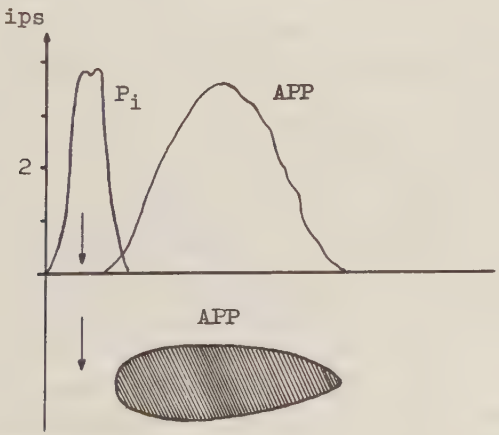


Abb. 4 Chromatogramm von synthetischer APP mit den vereinigten Fraktionen 12-18 des Dowex-50-H-Eluats in Phenol-Wasser zur Identifizierung der APP. Beschreibung siehe Text.

völlig übereinstimmt.Damit ist diese Fraktion aber praktisch frei von Phosphatverunreinigungen und muß daher nicht weiter behandelt werden.

Die hier beschriebene Standardmethode zur Isolierung der Phosphonosäuren ließ sich in zahlreichen Ansätzen so gut reproduzieren, daß weitgehendes Blindarbeiten auch ohne radioaktives Phosphat möglich ist und jene die gesuchten Phosphonosäuren enthaltenden Fraktionen ohne Schwierigkeiten mit großer Sicherheit vorausgesagt werden können. Diese Reproduzierbarkeit ist vor allem im Hinblick auf die Fütterungsversuche mit ^{14}C-markierten Verbindungen nötig, da die ^{14}C-Markierung in einer Vielzahl von Substanzen auftauchen kann,die über den ganzen Säulenlauf verteilt sind. Wie die scharfe Trennung in den Elutionsschemata der Abbn. 2 und 3 zeigt,ist sogar das Arbeiten mit Temperatur-konstanten Säulen unnötig, wie es sonst bei der säulenchromatographischen Trennung von Aminosäuren üblich ist.

2,3. Vorversuche zum chemischen Abbau von 2-AEP.

Die nach der vorstehend beschriebenen Methode isolierte ^{32}P-markierte AEP wurde für erste Versuche zum chemischen Abbau verwendet. Dazu wurde versucht, die C-2-Position der Phosphonosäure,die die Aminogruppe trägt,mit $KMnO_4$ zur Carboxylgruppe zu oxydieren und die entstandene Essigsäure über die sogenannte Schmidt-Reaktion abzubauen.Dabei wäre es wünschenswert gewesen, wenn bei dieser Oxydationsprozedur die Phosphonogruppe abgespalten würde, was durch das Auftreten von ^{32}Phosphat angezeigt worden wäre.Leider konnte die recht stabile P-C-Bindung auf diese Weise nicht gespalten werden. Außerdem ergaben sich dabei noch eine Reihe weiterer Schwierigkeiten; denn die alkalische Permanganatoxydation von ^{32}P-markierter AEP führt, wie die nachfolgenden Versuche zeigen, zu einer Vielzahl von Verbindungen,deren Isolierung und Reinigung einige Schwierigkeiten bereitet.

Wie Abb. 5 zeigt, führt die alkalische Permanganatoxyda-

tion von AEP in der Regel zu vier verschiedenen Substanzen, die sich chromatographisch auftrennen lassen und alle noch Phosphonosäuren darstellen, während eine Freisetzung von Orthophosphat und somit eine Spaltung der P-C-Bindung nicht zu beobachten ist. Eine Spaltung dieser Bindung ist wahrscheinlich nur auf der Stufe des Aldehyds möglich,wie spätere Versuche zeigten,der unter diesen Bedingungen jedoch nicht entstehen dürfte, da Permanganat sofort bis zur Carboxylgruppe durchoxydiert.

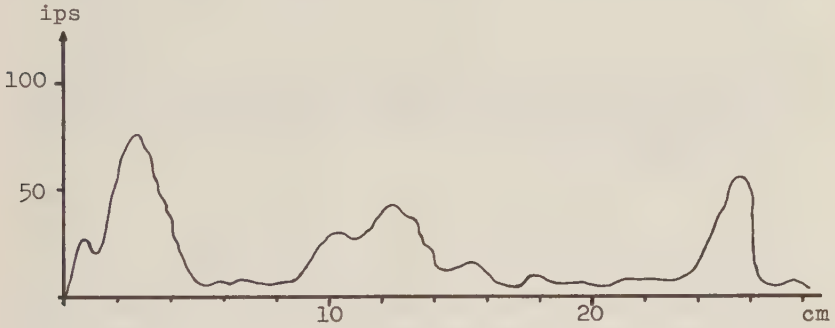


Abb. 5 Chromatogramm der Oxydationsprodukte von AEP nach alkalischer Permanganatoxydation. AEP wurde wie üblich isoliert, mit NaOH auf p_H 13 gebracht und auf dem Wasserbad bei 75°C solange unter Zusatz von $KMnO_4$ oxydiert,bis eine leichte Rotfärbung nach 10 Minuten erhalten bleibt.MnO_2 wurde abfiltriert,gewaschen und die radioaktive Lösung nach Dowex-50-H-Behandlung gefriergetrocknet. Ein Aliquot wurde in Phenol - Wasser (80 : 20) chromatographiert. Gemessen wurde ^{32}P mit dem Dünnschicht-Scanner.

Die säulenchromatographische Trennung der Oxydationsprodukte von AEP an Dowex-1-Formiat (1 x 6 cm) liefert bei Elution mit 1 N Ameisensäure zwei breite, gut voneinander getrennte Plateaus, die allerdings nach papierchromatographischer Analyse ebenfalls mehrere Substanzen enthalten.Eine erneute Oxydation der Substanzen dieser beiden Plateaus mit al-

kalischem Permanganat liefert noch weit unübersichtlichere Verhältnisse, obwohl danach in größerem Umfange eine Freisetzung von Phosphat zu beobachten ist, was jedoch möglicherweise auf eine vollständige Oxydation der AEP zurückzuführen ist. Auf Grund der angeführten Ergebnisse ist diese Methode in keiner Weise für einen chemischen Abbau der AEP zur Ermittlung der Radioaktivitätsverteilung in den einzelnen Positionen geeignet, da für solche Arbeiten wohldefinierte Verbindungen nötig sind.

3. Untersuchungen zur Biosynthese von AEP mit markierten Substanzen am intakten Organismus.

3,1. Untersuchungen mit ^{32}Phosphat.

Die Anzucht und Aufarbeitung der Tetrahymena-Kulturen erfolgt in der bereits beschriebenen Weise. Das in Abb. 2 wiedergegebene Elutionsdiagramm der Dowex-50-H-Säule zeigt drei deutlich sichtbare Radioaktivitätsmaxima, von denen das erste in der Hauptsache anorganisches Phosphat, das zweite wesentlich kleinere zwischen den Fraktionen 12 und 18 APP und das dritte in den Fraktionen 29 bis 33 erscheinende schließlich die vor allem von Tetrahymena gebildete AEP enthält. Tabelle 4 zeigt eine Zusammenstellung der Reinigungsschritte, sowie die Ausbeuten der aus ^{32}Phosphat in Tetrahymena gebildeten Phosphonosäuren an zwei Versuchen, die die besten und schlechtesten Bildungsraten an AEP wiedergeben.

Die in den Inkubationsansätzen enthaltenen 140 µM Phosphat entstammen ausschließlich dem Hefe-Extrakt, von dem 1 g 464,4 µM Gesamtphosphat enthält, während das trägerfrei zugesetzte ^{32}Phosphat bei der Berechnung vernachlässigt werden kann. Unter der Voraussetzung, daß das gesamte Phosphat des Inkubationsmediums Tetrahymena uneingeschränkt zur Verfügung steht, ist die in den jeweiligen Fraktionen vorliegende Radioaktivität ein direktes Maß für die eingebaute Phosphatmenge,

	Versuch A			Versuch B		
	Radioakt. (in ipm)	µMol	% bezogen auf die aufgenommene Menge	Radioakt. (in ipm)	µMol	% bezogen auf die aufgenommene Menge
Angebotene Menge	$4,2 \cdot 10^7$	140	-	$4,2 \cdot 10^7$	140	-
Aufgenommene Menge $^{32}PO_4^{3-}$ (= Säurehydrolysat)	$4,2 \cdot 10^6$	14	-	$4,15 \cdot 10^6$	13,7	-
APP-Fraktion (nach Dowex-50-Säule, Fraktion 12-18)	$1,36 \cdot 10^4$	0,045	0,32	$1,29 \cdot 10^4$	0,043	0,31
AEP-Fraktion (nach Dowex-50-Säule, Fraktion 29-33)	$3,8 \cdot 10^5$	-	9	$1,37 \cdot 10^5$	-	3,3
AEP-Fraktion (nach Dowex-1-Ac-Säule, Fraktion 5-7)	$2,52 \cdot 10^5$	0,84	6	$1,25 \cdot 10^5$	0,41	3

Tabelle 4. Reinigungsschritte und Ausbeuten der aus ^{32}Phosphat in Tetrahymena gebildeten Phosphonoaminosäuren

deren spezifische Aktivität sich aus Tabelle 4 mit $3 \cdot 10^5$ ipm / µM errechnet.

Wie aus Tabelle 4 ersichtlich ist, zeigt sich zwischen den beiden Versuchen eine große Übereinstimmung, obwohl es sich bezüglich der AEP-Synthese um die beiden Grenzwerte handelt, zwischen denen sich die übrigen Versuche bewegen. Übereinstimmend zeigen die Versuche eine Aufnahme von 10 % des angebotenen Phosphats und einen Einbau von etwa 0,3 % des aufgenommenen Phosphats in APP, was im Vergleich zu den Ergebnissen von Kittredge und Hughes[4] sehr wenig ist. Es ist hier allerdings zu bedenken, daß die Kulturen unter unseren Bedingungen mit limitierenden Mengen Glucose wuchsen. Bei solch geringen Bildungsraten ist eine Isolierung von APP aus Ansätzen mit ^{14}C-markierter Glucose nicht möglich, da unter der Vielzahl der auftretenden markierten Verbindungen die geringe ^{14}C-Markierung in APP kaum wiederzufinden sein dürfte. Daß eine solch geringe Menge neben einem großen Überschuß an Phosphat und anderen Substanzen mit nur einer Säulenchromatographie so sauber abgetrennt werden konnte (Abb. 4), spricht für die Brauchbarkeit der Isolierungsmethode.

Der nach der zweiten Säulenchromatographie gefundene Abfall der Radioaktivität in der AEP - Fraktion ist in den beiden Ansätzen sehr unterschiedlich (Tab. 4). In Versuch A ist ein Abfall von 9 auf 6 %, in Versuch B hingegen nur einer von 3,3 auf 3 % der aufgenommenen Radioaktivität zu beobachten. Dies dürfte auf eine unterschiedliche Bildungsrate weiterer Phosphonosäuren zurückzuführen sein; denn bei Anwendung einer anderen Isolierungsmethode als der hier beschriebenen konnten bei einer Reihe von Ansätzen neben den beiden bereits genannten noch mindestens fünf weitere Phosphonoverbindungen festgestellt werden. Diese kommen bei der als Standardmethode angewandten Elution mit 0,6 N HCl unmittelbar vor (Abb. 2, Fraktionen 25-27) oder zusammen mit AEP von der Kationenaustauschersäule; durch Elution mit Wasser gelingt es jedoch, das Elutionsdiagramm auseinanderzuziehen und das Vorhandensein mehrerer Peaks zu zeigen, wobei AEP als breites Plateau auftritt (Abb. 6). Wegen ihrer äußerst geringen Menge konnten diese Verbindungen nicht näher charakterisiert werden, doch

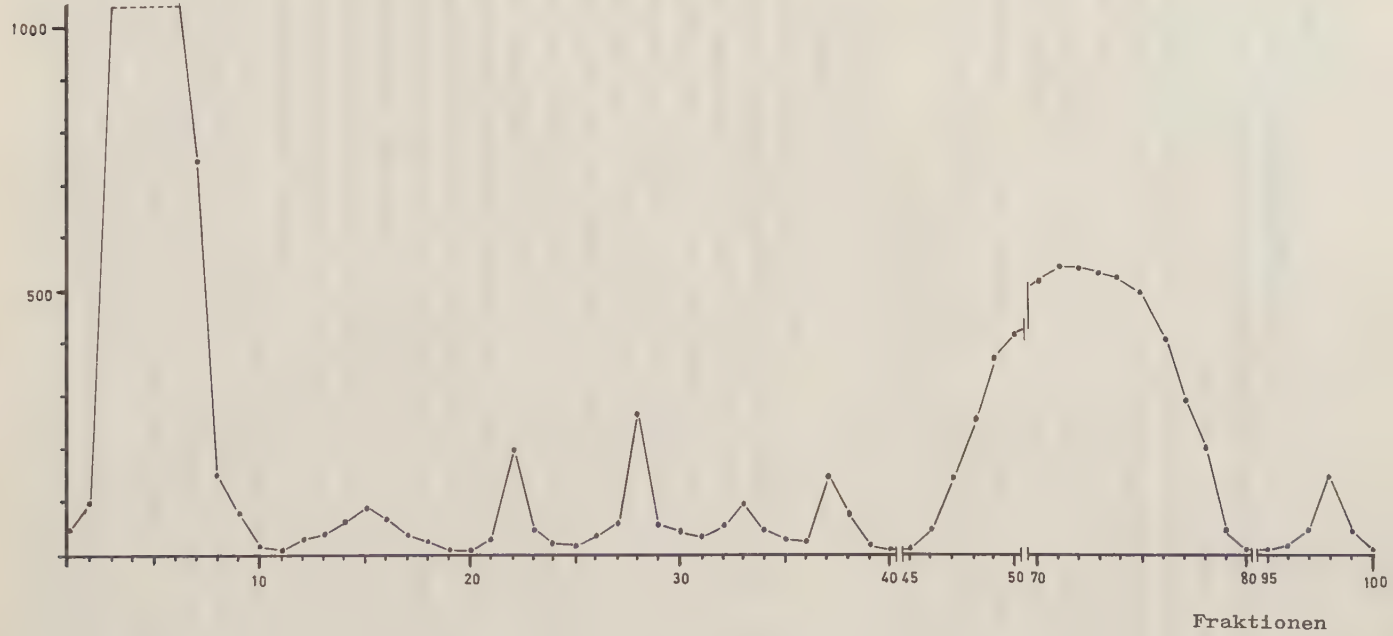


Abb. 6. Elutionsdiagramm der ^{32}P-markierten Verbindungen des Säurehydrolysats an einer Dowex-50-H^+-Ionenaustauschersäule bei Elution mit Wasser.

scheinen sie auf Grund papierchromatographischer Untersuchungen nicht mit einer der zur Zeit käuflichen Phosphonoaminosäuren identisch zu sein.

Zweidimensionale Papierchromatographie der AEP nach der Dowex-1-Fraktionierung in den Laufmitteln A und B zeigt im Radioautogramm eine einheitliche Substanz, so daß das Heranziehen der Radioaktivität als Grundlage für die Berechnung der AEP-Bildung legitim ist. Die radioaktive Einheitlichkeit der Substanz schließt jedoch noch nicht eine Verunreinigung durch andere Aminosäuren aus, da bei Verwendung von ^{32}Phosphat allein AEP markiert sein kann. Um das Vorhandensein von Verunreinigungen zu überprüfen, wurde das Chromatogramm durch Behandlung mit Ninhydrin angefärbt. Neben dem mit der Radioaktivität übereinstimmenden AEP - Farbfleck konnten noch eine Reihe weiterer Ninhydrin-positiver Flecken nachgewiesen werden. Vor allem im Hinblick auf die späteren ^{14}C-Versuche ist daher eine weitere Reinigung erforderlich, die durch mehrfaches Umkristallisieren der AEP aus 60 %igem Äthanol erfolgt. Wie Tabelle 5 zeigt, bleibt die spezifische Radioaktivität der AEP nach der Elution von der Anionenaustauschersäule über drei Umkristallisationen konstant, doch konnte selbst nach zehnmaliger Umkristallisation keine Änderung der spezifischen Aktivität festgestellt werden.

	Fraktion 5-7 der Dowex-1-Säule plus Träger	Nach 1 Umkristallisationen	2 Umkristallisationen	3 Umkristallisationen
Menge in mg	50,0	38,8	28,2	25,2
Gesamtradioaktivität in ipm	239.500	185.076	134.852	120.985
Spezifische Aktivität	4.790	4.770	4.782	4.801

Tabelle 5. Spezifische Radioaktivität der AEP nach mehrfacher Umkristallisation.

Der unter unseren Bedingungen erzielte Einbau von 3 - 6 % des aufgenommenen Phosphats in AEP durch Tetrahymena (Tab. 4) ist im Verhältnis zu den von Kandatsu und Horiguchi[2] ermittelten Spitzenwerten von 13 und mehr Prozent nur sehr gering, doch muß auch hier wieder darauf hingewiesen werden, daß die Kulturen nicht unter optimalen Bedingungen wuchsen, da Glucose limitierender Faktor war.

Um auszuschließen, daß es sich bei den als Phosphonosäuren bezeichneten Verbindungen um besonders stabile Phosphatester handelt, wurden alle gefundenen ^{32}P-markierten Verbindungen einer Phosphatasebehandlung unterzogen. Diese Behandlung erbrachte in keinem Falle eine Freisetzung von Orthophosphat, so daß die Vermutung, diese Substanzen müßten Phosphonoverbindungen sein, berechtigt war. Außerdem zeigt dies Ergebnis, daß die P-C-Bindung gegenüber den herkömmlichen Phosphatasen unempfindlich zu sein scheint, obwohl seit einiger Zeit Bacterien bekannt sind, die diese P-C-Bindung spalten und auf AEP als einziger Phosphatquelle wachsen können[37]. Die Untersuchungen zeigten jedoch bei AEP, daß sich die radioaktiven Flecken bei der Rechromatographie teilweise auftrennten, wobei der eine mit AEP identisch war und erwartungsgemäß Ninhydrin-positiv reagierte, während der zweite, sehr viel weiter laufende Fleck negativ reagierte, so daß es sich bei dieser neuauftretenden Verbindung höchstwahrscheinlich um Oxydationsprodukte der AEP handelt. Die Phosphatase - behandelten Proben zeigten ein völlig analoges Verhalten.

Bei Routineuntersuchungen war es möglich, mit Hilfe der Papierchromatographie aus den die Hauptmenge des Orthophosphats enthaltenden Fraktionen 3 - 5 (Abb. 2) eine markierte Verbindung abzutrennen, bei der es sich auf Grund der ^{32}P-Markierung trotz der drastischen Säurehydrolyse offenbar um eine Phosphonoverbindung handeln muß. Bei absteigender Chromatographie auf Schleicher & Schüll 2040 B mit Phenol - Wasser (80 : 20) als Laufmittel ergibt die Substanz einen scharfen Fleck bei einem R_f von 0,26. Da man annehmen darf, daß eine Aminogruppe in einer Verbindung die Elution dieser Substanz von einer Kationenaustauschersäule mit der Front verhindert

und Ketoverbindungen in der Regel höhere R_f - Werte besitzen als die homologen Verbindungen ohne Ketogruppe, wurde als Arbeitshypothese angenommen, daß es sich bei dieser Verbindung um eine Ketophosphonosäure handelt. Zur Prüfung dieser Annahme wurde deshalb versucht, durch Reaktion mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin[38] das Vorhandensein einer Ketogruppe zu demonstrieren, da keinerlei Vergleichssubstanzen zur Verfügung standen und für eingehendere Untersuchungen zu geringe Mengen von dieser Verbindung isoliert werden konnten.

Zu diesem Zweck wurde die Substanz halbiert. Mit der einen Hälfte wurde die Reaktion mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin durchgeführt, während die andere Hälfte unbehandelt mit der behandelten in Phenol - Wasser (80 : 20) rechromatographiert wurde. Wie Abb. 7 zeigt, besteht zwischen den beiden Proben ein deutlicher Unterschied. Die mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin behandelte Probe ist hinter der unbehandelten Substanz zurückgeblieben und besitzt jetzt einen R_f - Wert von 0,18. Trotzdem

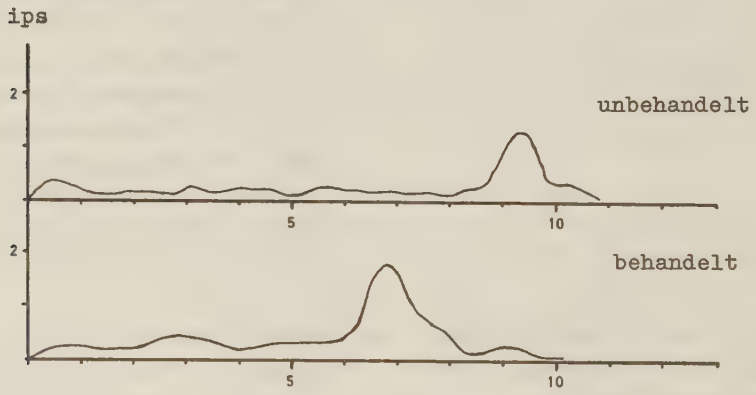


Abb. 7 Einfluß der Umsetzung mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin auf den R_f einer mit der Front von Dowex-50 eluierten Phosphonoverbindung. Nach der papierchromatographischen Abtrennung der Substanz vom Phosphat erfolgte die Isolierung durch Elution vom Chromatogramm. Die weitere Behandlung erfolgt wie im Text beschrieben, die Radioaktivität wurde mit Hilfe eines Dünnschicht-Scanners lokalisiert.

kann die neue Verbindung vor allem wegen ihrer möglichen Instabilität nicht eindeutig als Ketophosphonosäure angesprochen werden.

3,2. Untersuchungen mit positionsmarkierten Glucosen.

Die schon beschriebene Standardisolierungsmethode wird bei den Arbeiten über den Einbau von positionsmarkierten Glucosen in AEP ohne jede Abänderung übernommen, da sie durch ihre gute Reproduzierbarkeit erlaubt, "blind" zu arbeiten, d.h., daß es nicht notwendig ist, jede einzelne Fraktion der Säulen chromatographisch auf den Gehalt an Phosphonosäuren zu überprüfen.

Aus dem in Abb. 8 dargestellten Elutionsschema des Glucose-U-^{14}C - Ansatzes am Kationenaustauscher ist zu ersehen, daß die Verhältnisse beim Arbeiten mit ^{14}C-markierten Substraten im Vergleich zu den mit ^{32}Phosphat durchgeführten,wo nur Orthophosphat und Phosphonosäuren als markierte Verbindungen auftraten, wesentlich komplizierter sind, da aus ^{14}C-markierter Glucose eine Vielzahl von markierten Verbindungen entsteht,die bis auf zwei - Serin und Äthanolamin,die in größerem Umfange entstehen - nicht näher untersucht wurden und in diesem Zusammenhang auch nicht weiter interessant sind. Wie aus Abb. 8 durch Vergleich mit dem ^{32}P-Elutionsdiagramm weiter zu ersehen ist, verteilen sich die AEP - enthaltenden Fraktionen auf zwei ineinander übergehende Peaks.

In der Regel würde man so verfahren, daß man nur die nach dem ^{32}P-Schema AEP - enthaltenden Fraktionen der beiden Peaks zur weiteren Reinigung an der Anionenaustauschersäule fraktioniert.Dieses Verfahren würde zweifellos die Aufarbeitungsprozedur erheblich vereinfachen. Da andererseits aber trotz der guten Reproduzierbarkeit des mit ^{32}Phosphat ausgearbeiteten Isolierungsverfahrens kleinere Verschiebungen in Betracht gezogen werden müssen,wurden die beiden in Frage kommenden Peaks getrennt an der Dowex-1-Ac-Säule fraktioniert. Das Elutionsdiagramm ist zusammen mit dem von ^{32}P-markierter

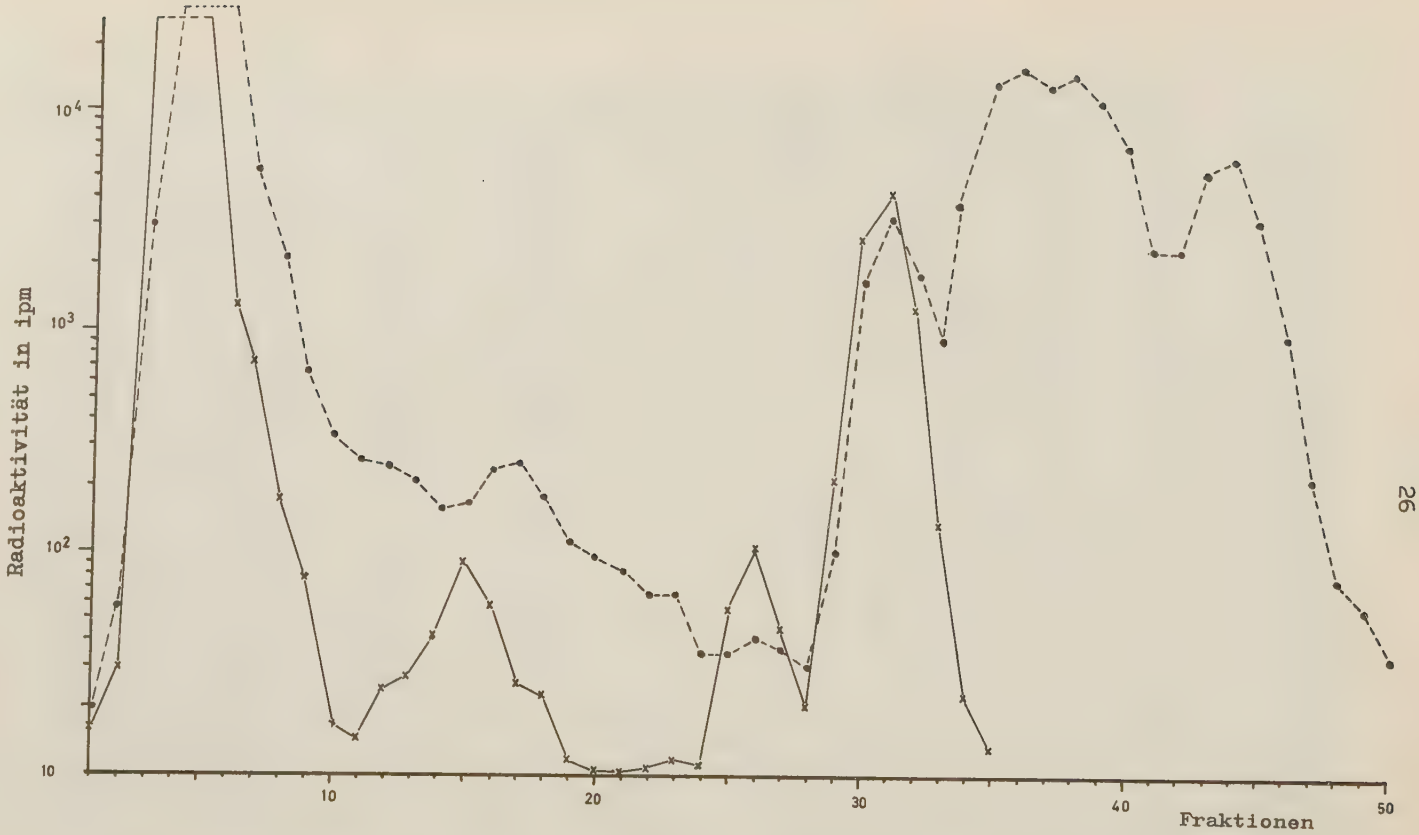


Abb. 8. Elutionsdiagramm der Säurehydrolysate von ^{32}Phosphat- und ^{14}C-Glucose-Ansätzen an einer Dowex-50-H-Ionenaustauschersäule bei Anwendung der Standardmethode. (x——x ^{32}P, ●---● Gluc.)

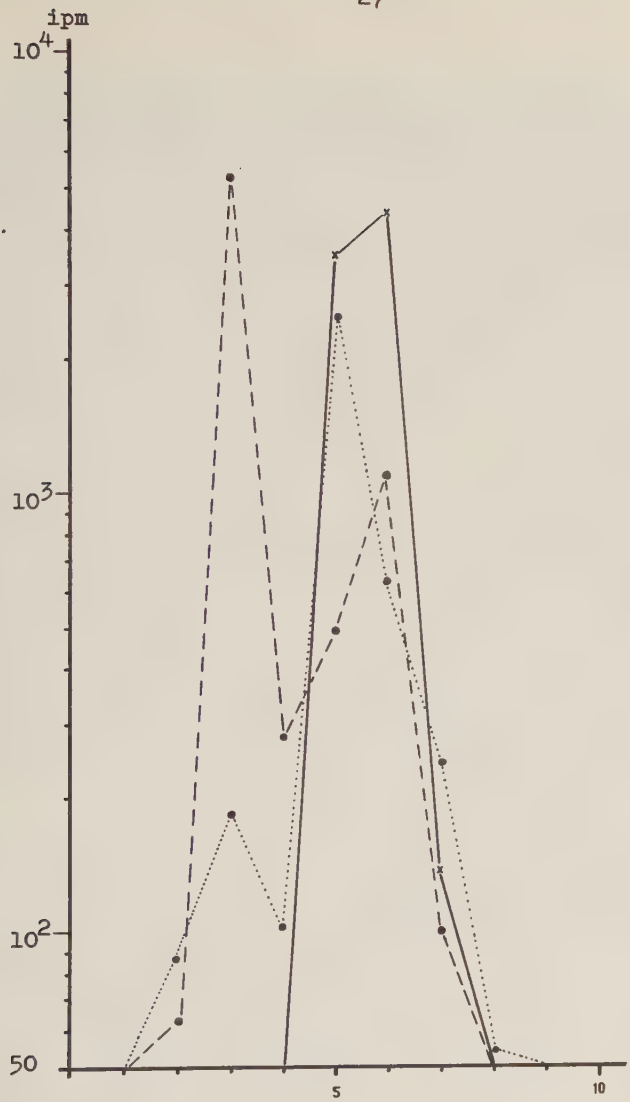


Abb. 9 Elutionsdiagramm von ^{32}P-AEP sowie der beiden Peaks der Dowex-50-Chromatographie der Glucoseansätze an einer Dowex-1-Ac-Ionenaustauschersäule.
(● ——— ● ^{32}P-AEP, ● ----- ● Peak 1, ● ····· ● Peak 2)

AEP für beide Peaks in Abb.9 wiedergegeben. Im Vergleich zu den Arbeiten mit ^{32}Phosphat, wo alle Radioaktivität, die nicht

in Form von Phosphonoaminosäuren gebunden vorlag, in den ersten Fraktionen als Orthophosphat von der Kationenaustauschersäule eluiert wurde, ist die Effektivität der einzelnen Reinigungsschritte, wie aus Abb. 8 und Tabelle 6 hervorgeht, beim Arbeiten mit ^{14}C-markierter Glucose wegen der Vielzahl der markierten Substanzen nach der Vorfraktionierung an Dowex-50-H^+ nicht so deutlich.

Während bei den ^{32}Phosphat-Versuchen die Radioaktivität der AEP-enthaltenden Fraktionen der Kationenaustauschersäule nur noch maximal um 33 % nach der Anionenaustauscherfraktionierung abfällt (Tab. 4), erfolgt bei beiden im fraglichen Bereich auftretenden Peaks des ^{14}C-Ansatzes bei der Chromatographie an der Dowex-1-Ac-Säule eine Aufspaltung in zwei Peaks (Tab. 6 und Abb. 9), von denen jeweils der zweite mit dem von ^{32}P-AEP gut übereinstimmt (Abb. 9).Um bei der Reinigungsprozedur einen direkten Vergleich mit den spezifischen Aktivitäten (ipm / mg) aus Tabelle 7 zu ermöglichen, wurden Aliquots so gewählt, daß die Impulszahlen der Tabelle 6 2 % der Gesamtradioaktivität der jeweiligen Probe ausmachen, da die Fraktionen der Anionenaustauschersäule vor der Umkristallisation mit 50 mg Träger-AEP versetzt werden.

Aufgenommene Menge (Säurehydrolysat) Radioakt. in ipm	Dowex-50-Säule Fraktion	Radioakt. (in ipm)	Dowex-1-Säule Fraktion	spez. Aktivität	Bezeichng.
$4{,}6 \cdot 10^5$	31 - 34	15.000	3 - 4	10.612	1 / 1
			6 - 8	4.165	1 / 2
	35 - 42	149.452	3 - 4	2.436	2 / 1
			5 - 8	572	2 / 2

Tabelle 6. Reinigung der ^{14}C-AEP durch Ionenaustauschersäulenchromatographie. (Die Radioaktivität ist in ipm/Aliquot = 2 % der Gesamtradioaktivität angegeben.)

Zweidimensionale Chromatogramme der beiden AEP-enthaltenden Peaks nach der Chromatographie an Dowex-50-H in den Laufmitteln A und B zeigten neben AEP noch eine große Zahl von markierten Substanzen, wie aus den Ninhydrin-positiven Verunreinigungen bei den Versuchen mit ^{32}Phosphat zu erwarten war. Auch nach der Fraktionierung am Anionenaustauscher erhält man erwartungsgemäß noch keine völlig reinen AEP-Fraktionen, so daß eine endgültige Reinigung nach Zusatz von 50 mg synthetischer AEP durch Umkristallisation aus 60 %igem Äthanol, in dem alle übrigen Aminosäuren noch löslich sind[36], erfolgen muß.

Diese weitere Reinigung der Dowex-1-Ac-Fraktionen aus Tabelle 6 durch Umkristallisation wird in Tabelle 7 gezeigt, wobei zum Vergleich nochmals die spezifische Radioaktivität von ^{32}P-AEP angeführt wurde, die während der Umkristallisation nach der Elution von der Anionenaustauschersäule konstant bleibt.

Aus Abb. 9 geht hervor, daß sich die beiden nach der Dowex-50-H-Fraktionierung erhaltenen Peaks an der Anionenaustauschersäule erneut in zwei Peaks aufspalten, von denen jeweils der zweite - im Folgenden als 1/2 bzw. 2/2 bezeichnet - gut mit dem ^{32}P-AEP - Peak übereinstimmt. Diese beiden Fraktionen erlangen auch, wie Tabelle 7 zeigt, sehr schnell eine konstante spezifische Aktivität, so daß die Reinigung spätestens nach der dritten Umkristallisation als abgeschlossen gelten kann. Ein Vergleich dieser beiden Fraktionen untereinander zeigt, daß Fraktion 1/2 nahezu reine AEP, Fraktion 2/2 hingegen noch etwa 50 % Verunreinigungen enthält, die aber schon während der ersten Umkristallisation verschwinden. Demgegenüber zeigen die beiden anderen Fraktionen - im Folgenden als 1/1 bzw. 2/1 bezeichnet - ein völlig anderes Verhalten. Bei diesen Fraktionen ist während der Umkristallisation mit Träger-AEP ein laufendes Abnehmen der spezifischen Aktivität zu beobachten. Dieser Abfall ist bei Fraktion 1/1 besonders stark; denn im Laufe von drei Umkristallisationen ist sie von 10.612 ipm/mg auf 23 ipm/mg abgefallen, und bei anderen Versuchen konnte sogar ein Abfall von 26.500 ipm/mg auf 23 ipm/mg nach der zweiten Umkristallisation beobachtet werden.

Fraktionen der Dowex-1-Säule		Fraktionen der Dowex-1-Säule + Träger	Nach 1 Umkristallisation	Nach 2 Umkristallisationen	Nach 3 Umkristallisationen
1/1	Menge in mg	50,0	39,5	30,5	26,8
	Radioakt.(ipm)	530.600	14.020	3.818	620
	ipm / mg	10.612	355	125	23
1/2	Menge in mg	50,0	41,4	30,9	27,6
	Radioakt.(ipm)	208.250	165.103	122.878	110.432
	ipm / mg	4.165	3.988	3.976	4.001
2/1	Menge in mg	50,0	33,2	19,4	14,3
	Radioakt.(ipm)	121.800	8.142	3.234	1.758
	ipm / mg	2.436	245	166	123
2/2	Menge in mg	50,0	47,8	38,7	27,8
	Radioakt.(ipm)	28.600	9.793	7.714	5.727
	ipm / mg	572	204	199	206
entspr. Fraktionen eines Phosphat-Ansatzes	Menge in mg	50,0	38,8	28,2	25,2
	Radioakt.(ipm)	239.500	185.076	134.852	120.985
	ipm / mg	4.790	4.770	4.782	4.801

Tabelle 7. Spezifische Radioaktivität der Dowex-1-Ac-Fraktionen nach mehrfacher Umkristallisation mit Träger-AEP.

Die beschriebenen Einbauversuche mit positionsmarkierten Glucosen am intakten Organismus erbrachten alle einen für einen Abbau ausreichenden Einbau des markierten Glucoseteils in die von Tetrahymena gebildete AEP. Für die Untersuchungen wurden bei einem Angebot von generell 0,5 mM Trägerglucose folgende positionsmarkierten Glucosen verwendet: Glucose-U-^{14}C,

-1-^{14}C, -6-^{14}C sowie -2-^{14}C.Die dabei eingesetzte Radioaktivität - und damit die spezifische Aktivität - ist in Tabelle 8 zusammengefaßt. Da bei der Reinigung durch Umkristallisation stets 50 mg Träger-AEP zugesetzt wurden,kann man aus der nach der Reinigung verbliebenen Radioaktivität und Träger-AEP auf die gesamte in AEP eingebaute Radioaktivität umrechnen (Tabelle 8). Über die Gesamtradioaktivität kann aus der bekannten spezifischen Aktivität der gefütterten Glucose der Glucoseeinbau in AEP berechnet werden, wie es in Tabelle 8 geschehen ist.

			Glucose-		
		U-^{14}C	1-^{14}C	6-^{14}C	2-^{14}C
Angebotene Menge	Radioaktivität (ipm)	$7{,}6 \cdot 10^7$	$9{,}0 \cdot 10^7$	$10{,}1 \cdot 10^7$	$9{,}0 \cdot 10^7$
	m Mole	0,5	0,5	0,5	0,5
Erhalten nach Umkristallisation	Radioaktivität (ipm)	52.000	57.200	116.000	142.000
	Menge in mg	28,5	17,7	29,3	38,0
In AEP eingebaute Gesamtradioaktivität in ipm		91.350	161.200	198.000	210.000
Glucoseeinbau in nM (10^{-9} M)		600	896	980	1.168

Tabelle 8. Einbau von gefütterten positionsmarkierten Glucosen in AEP durch Tetrahymena pyriformis.

Da sich die Einbauraten der einzelnen gefütterten Glucosen nicht so grundlegend voneinander unterscheiden (Tab. 8) - wenn man davon absieht, daß Glucose-U-^{14}C einen etwa 30 % niedrigeren Einbau als die übrigen zeigt,was sich aber damit erklären läßt, daß 30 % der markierten C-Atome durch Decarboxylierung verlorengehen - ist es nicht möglich,auf Grund der hier vorliegenden Ergebnisse schon irgendeine Vorentschei-

dung über den Weg der Glucose bis zum Einbau in AEP zu fällen.

Die optimale Inkubationszeit der Versuchsansätze.

Da Tetrahymena nach den bisher vorliegenden Ergebnissen[3] AEP nur während des Zellwachstums synthetisiert, ist der Einbau von Glucose und ^{32}Phosphat in AEP durch die Kulturen ein Hinweis dafür, daß Tetrahymena nach der Überführung in das Inkubationsmedium wieder in eine Wachstumsphase eintrat. Genauere Untersuchungen über den günstigsten Inkubationszeitraum wurden jedoch nicht angestellt. Solche Untersuchungen erübrigten sich jedoch auch, da nach Beendigung der Inkubationsperiode noch etwa 20 % der eingesetzten Radioaktivität im Medium verblieben sind.

Dabei handelt es sich nicht um nichtaufgenommene Glucose; denn nur in zwei Fällen konnten etwa 10 % der im Medium verbliebenen Aktivität als Glucose identifiziert werden, während sich die Hauptmenge der Radioaktivität auf bis zu fünf Fettsäuren verteilte, die jedoch nicht identifiziert wurden. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von Seaman[39] überein, wonach es im Medium wachsender Tetrahymena-Kulturen zu einer Anhäufung von Fettsäuren kommt, die scharf abfällt, wenn die Kulturen ihre maximale Dichte erreicht haben. Diese Beobachtungen sprechen dafür, daß unter den gewählten Kulturbedingungen das Maximum im Wachstum gerade erreicht war oder nur leicht überschritten wurde, so daß für die Synthese von AEP ein optimaler Inkubationszeitraum gewählt wurde, während die Mediumszusammensetzung nicht unbedingt als optimal anzusehen ist.

3,3. Untersuchungen mit positionsmarkiertem Serin und Äthanolamin.

Die Fütterungsversuche mit Serin und Äthanolamin wurden ganz analog jenen mit markierter Glucose durchgeführt. Um vergleichbare Daten zu erhalten, wurde die gleiche Mediumszusam-

mensetzung wie bei den Glucoseansätzen gewählt, nur wurden dem Inkubationsmedium noch zusätzlich 10 mg DL-Serin bzw. 10 µM Äthanolamin zugesetzt. Wie aus Tabelle 9 ersichtlich ist, verbleibt dabei der größte Teil der angebotenen Radioaktivität im Medium; und nur etwa 1,6 % finden sich im Säurehydrolysat. Dieser Anteil erniedrigt sich noch, da die Zellen vor der Hydrolyse nicht gewaschen, sondern nach dem Zentrifugieren sofort in der Säure suspendiert werden. Bei etwa 6 ml nasser Zellen in 300 ml Kulturmedium ist anzunehmen, daß von den 1,6 % nur 0,6 % wirklich aufgenommen werden, während die 1 % in der Masse der gepackten Zellen absorbiert waren, wofür auch die große Ähnlichkeit des Radioaktivitätsanteils in dem Säurehydrolysat der beiden Ansätze spricht (Tab. 9).

	Radioaktivität in ipm		
	Angebotene Menge	Im Medium verblieben	Säurehydrolysat
Serin	$11{,}8 \cdot 10^7$	$9{,}8 \cdot 10^7$	$1{,}9 \cdot 10^6 = 1{,}61$ %
Äthanolamin	$9{,}0 \cdot 10^7$	$7{,}9 \cdot 10^7$	$1{,}5 \cdot 10^6 = 1{,}67$ %

Tabelle 9. Verwertung von Serin und Äthanolamin durch Tetrahymena - Kulturen.

Ein Hinweis dafür, daß zumindest ein kleiner Teil aufgenommen wurde, ergibt sich aus den Elutionsdiagrammen an der Dowex-50-H-Säule, wo neben den Substanzpeaks noch in geringem Umfange andere Peaks auftraten.

Während bei den Äthanolaminversuchen nach der Dowex-1-Fraktionierung in den fraglichen Fraktionen ein kleiner Peak auftrat, dessen Radioaktivität jedoch nicht für Umkristallisationen oder chromatographische Identifizierungen ausreichte, konnten bei den Serinversuchen keinerlei Spuren von AEP nachgewiesen werden.

4. Chemischer Abbau der aus positionsmarkierten Glucosen entstandenen AEP.

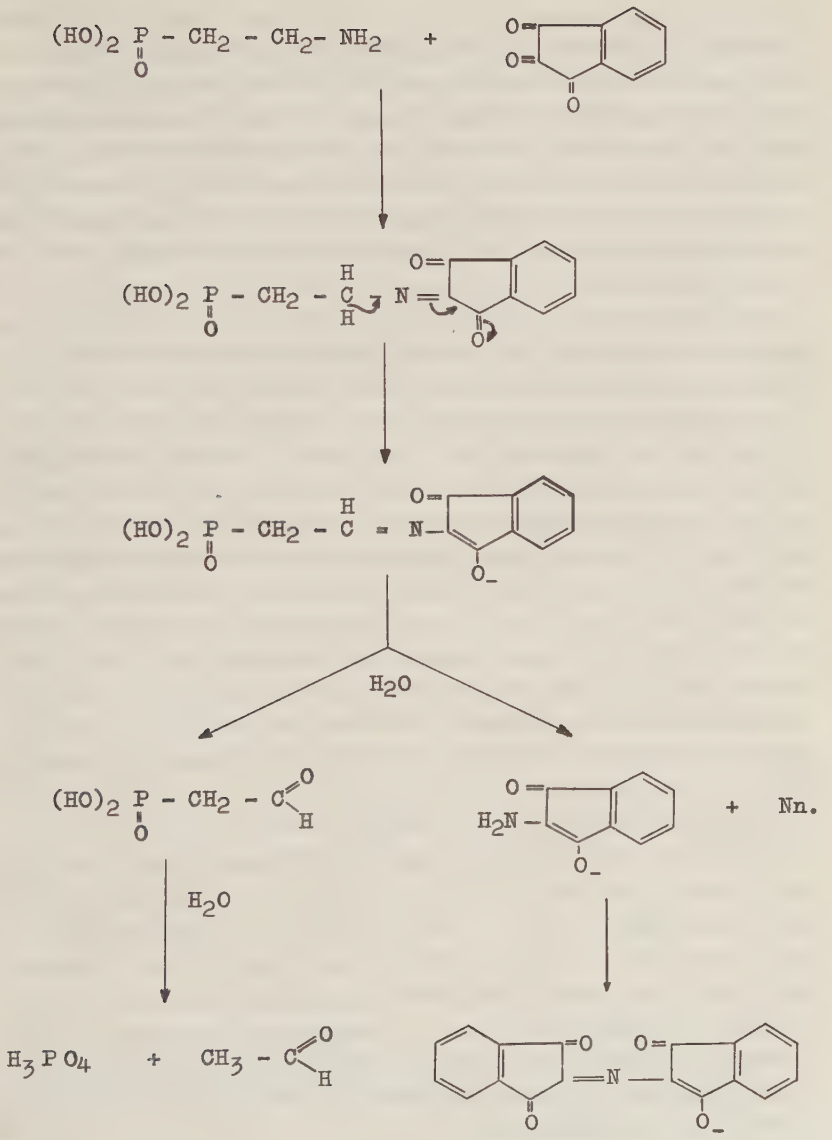
Da aus dem Einbau einer positionsmarkierten Verbindung in das gesuchte Endprodukt noch keine genaueren Aussagen über die Position der Markierung in der Substanz und somit über deren genauen Biosyntheseweg gemacht werden können, ist es nötig, durch einen schrittweisen Abbau der gereinigten Verbindung die Verteilung der Markierung zu ermitteln.

Wie aus Abb. 5 zu ersehen ist, entstehen bei der Behandlung der AEP mit alkalischem Permanganat eine Vielzahl von Verbindungen, so daß diese Methode nicht zum Abbau angewandt werden kann. Eine neuere Arbeit von De Koning [40], wonach bei einer Reaktion von AEP mit Ninhydrin Acetaldehyd und Phosphat entstehen sollen, löst die erste Stufe des Abbauproblems. Der von De Koning vorgeschlagene Reaktionsmechanismus ist in Schema I wiedergegeben.

Der bei dieser Reaktion entstehende Acetaldehyd wird sofort zu Essigsäure oxydiert, die ihrerseits relativ einfach isoliert und über den Schmidt - Abbau in zwei wohldefinierte Verbindungen, CO_2 und Methylamin, überführt werden kann. Die Radioaktivität dieser beiden Abbauprodukte kann ohne Schwierigkeiten bestimmt werden.

Die für den chemischen Abbau notwendige Überführung der isolierten AEP in Acetaldehyd wird in der von De Koning beschriebenen Weise durchgeführt. Zu diesem Zweck werden 250 mg Ninhydrin in 10 ml Methylcellosolve und 10 mg $SnCl_2 \cdot 2\ H_2O$ in 10 ml Succinatpuffer p_H 5,0, der anstelle des von De Koning verwendeten Acetatpuffers genommen wurde, um eine Verdünnung der Radioaktivität zu vermeiden, gelöst und nach Vereinigung zu etwa 30 mg der jeweiligen AEP zugesetzt und acht Stunden auf dem siedenden Wasserbad unter einem leichten Stickstoffstrom erhitzt. Der Stickstoffstrom wird aus dem Reaktionsgefäß in eine gesättigte Kaliumdichromat - Lösung in 6 N H_2SO_4 geleitet, die ebenfalls auf dem Wasserbad erhitzt wird. An dieses Oxydationsgefäß sind ein Rückflußkühler sowie eine Falle mit NaOH angeschlossen.

Nach Umsetzung der AEP mit Ninhydrin und der Oxydation



Schema I. Mechanismus der Reaktion von AEP mit Ninhydrin

(nach De Koning [40])

des entstehenden Acetaldehyds mit saurer Kaliumdichromat-Lösung sind zwischen 20 und 25 % der in den Abbau eingesetzten Radioaktivität in Form von Ba-Carbonat aus der Falle mit NaOH fällbar. Diese an sich unerwarteten Ergebnisse deuten auf noch vorhandene Mängel in der Abbaumethodik hin. Sie dürften möglicherweise darauf zurückzuführen sein, daß vor allem zu Beginn der Abbauphase das Oxydationsmittel zu stark war und einen großen Teil des übergehenden Acetaldehyds vollkommen zu CO_2 oxydierte.

Im Reaktionsgefäß befinden sich unvermeidlich andere organische Substanzen, von denen ein Teil mit dem Stickstoffstrom in das Oxydationsgefäß übergetrieben und dort zusammen mit dem Acetaldehyd oxydiert wird. Dies zeigt sich vor allem an dem großen Überschuß an titrierbaren Carboxylgruppen nach der Wasserdampfdestillation sowie an den unverhältnismäßig großen Mengen an CO_2 und Amin, die während des Schmidt-Abbaus entstehen, obwohl nur zwischen 3,3 und 8,3 % der eingesetzten Radioaktivität in der Essigsäurefraktion erhalten werden konnte (Tab. 10), wobei sich diese etwa zu gleichen Teilen auf den Oxydations- und Reaktionsansatz verteilt. Aus diesem Grunde muß das Oxydationsmittel zwangsläufig so stark gewählt werden, da sonst schon vor Ende der Reaktion alles vollkommen reduziert ist. Andererseits stören diese Verbindungen den Abbau nicht weiter, da sie die beiden C-Atome der Essigsäure etwa gleich stark verdünnen.

Zur Isolierung der entstandenen Essigsäure wurde der Inhalt sowohl des Oxydations- als auch des Reaktionsgefäßes einer Wasserdampfdestillation unterworfen. Dabei wurden jeweils etwa 250 ml destilliert und das Destillat in eisgekühlter NaOH aufgefangen. Die durch die Wasserdampfdestillation erhaltene Fraktion wird nach Einengung am Rotationsverdampfer in ein 25-ml - Zweihals - Spitzkölbchen überführt und nach Bestimmung der Radioaktivität im Scintillationszähler völlig zur Trockne eingedampft.

Zum Schmidt-Abbau wird die trockene Substanz im Zweihals-Kölbchen in 0,5 ml konzentrierter Schwefelsäure, gegebenenfalls unter leichtem Erwärmen auf dem Wasserbad, vollständig gelöst und in Eis gestellt. Danach werden 100 - 150 mg Na-Azid

mit 1,5 ml konzentrierter Schwefelsäure versetzt und unter Erwärmung auf dem Wasserbad ebenfalls in Lösung gebracht. Nach Abkühlung der Azid-Lösung wird diese ins Reaktionsgefäß gegeben, der Gaseinleitungsaufsatz mit der Ableitungsvorrichtung aufgesetzt und die Fallen mit 5 % $KMnO_4$ in 1 N H_2SO_4 zur Zerstörung der übergehenden HN_3 sowie mit 0,1 N NaOH in der angegebenen Reihenfolge angeschlossen, wobei die Schliffe mit Phosphorsäure geschmiert werden. Danach wird die Apparatur eine Stunde im Eisbad mit CO_2-freiem Stickstoff durchspült und anschließend das Eisbad gegen ein Wasserbad ausgetauscht, das eine Stunde unter weiterer Stickstoffspülung bei 70°C gehalten wird. Nach Beendigung der Reaktion wird noch etwa eine Stunde bei Zimmertemperatur mit Stickstoff nachgespült.

Ganz allgemein entstehen beim Erhitzen von Carbonsäuren mit äquivalenten Mengen Stickstoffwasserstoffsäure in Gegenwart von starken Mineralsäuren CO_2 und Amine, die ein Kohlenstoffatom weniger als die Ausgangssäuren besitzen:

$$R - COOH + HN_3 \xrightarrow{H_2SO_4} R - NH_2 + CO_2 + N_2$$

Danach entstehen aus der eingesetzten Essigsäure durch Reaktion mit Stickstoffwasserstoffsäure im Schmidt-Abbau CO_2 und Methylamin.

Der Mechanismus dieser Reaktion ist dabei nach M. S. Newman wahrscheinlich folgender:

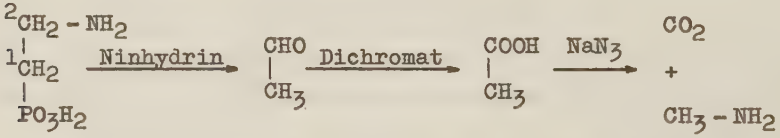
$$R - COOH + H^+ \longrightarrow H_2O + R - \overset{+}{C} = O \xrightarrow{HN_3} \left[\begin{array}{l} H\ddot{N} - N \equiv N: \\ R - \overset{|}{C} = O \end{array} \right]^+$$

$$\left[\quad\right]^+ \longrightarrow \left[R - NH - C = O\right]^+ + N_2 \xrightarrow{H_2O} R - NH_2 + CO_2$$

Das beim Schmidt-Abbau aus der markierten Essigsäure entstehende CO_2 wurde in CO_2-freier NaOH absorbiert und aus dieser mit einer 0,04 M Barium-Ammoniumchlorid-Lösung als Ba-Carbonat gefällt, auf einem Glasfilter abgesaugt, mit CO_2-freiem Wasser und Alkohol gewaschen, im Exsikkator getrocknet, ausgewogen und seine Radioaktivität am Endfensterzählrohr gemessen. Mit Hilfe der von Aronoff [41] angegebenen Selbstabsorp-

tionskurve wurde auf die Gesamtaktivität der Ba-Carbonat-Probe umgerechnet. Unter Berücksichtigung der Zählausbeuten von Endfensterzählrohr und Scintillationszähler, die mit Standardsubstanzen bestimmt wurden, wurden die am Endfensterzählrohr gemessenen Werte auf Scintillationszähler-Werte umgerechnet. Um diese über Endfensterzählrohrmessungen erhaltenen Werte abzusichern, wurde das erhaltene Ba-Carbonat in einer Vakuumapparatur wieder in Na-Carbonat überführt. Ein Aliquot wurde im Scintillationszähler ausgezählt, während mit dem Rest eine Ausbeutebestimmung durchgeführt wurde. Nennenswerte Unterschiede ergaben sich dabei zwischen den auf verschiedene Arten erhaltenen Werten nicht. Im Gegensatz zu der des CO_2 kann die Radioaktivität des nach dem Austreiben mit Alkali aus dem Reaktionsansatz durch Absorption in 0,1 N HCl als Hydrochlorid erhaltenen Methylamins sofort im Scintillationszähler bestimmt werden.

Die beiden Produkte des Schmidt-Abbaus, CO_2 und Methylamin, haben ihren Ursprung in den C-Atomen 2 bzw. 1 der AEP, deren Abbau sich folgendermaßen vollzog:



Die Radioaktivitätsverteilung auf die beiden Positionen der nach Fütterung der verschiedenen positionsmarkierten Glucosen entstandenen AEP, wie sie sich aus dem Schmidt-Abbau ergaben, sowie die Ausbeuten nach der Ninhydrin-Behandlung sind in Tabelle 10 zusammengefaßt.

Die Daten zeigen die vergleichsweise geringe Ausbeute nach der Ninhydrin-Dichromat-Behandlung. Diese liegt zwischen 3,3 % (beim Abbau von AEP aus Glucose-1-^{14}C) und 8,3 % (aus Glucose-2-^{14}C), während die Ausbeuten beim Schmidt-Abbau bei unseren Arbeiten stets über 95 % betrugen.

Die Signifikanz der Abbauergebnisse läßt sich am besten aus der Radioaktivitätsverteilung in der aus Glucose-U-^{14}C entstandenen AEP ablesen; denn in diesem Fall müßten beide Positionen die gleiche Aktivitätsverteilung zeigen, gleich-

gültig,welcher Biosyntheseweg eingeschlagen wurde.Die Abbauergebnisse zeigen jedoch nicht die erwartete Gleichverteilung; denn die Position 1, die beim Abbau zur Methylgruppe wird,besitzt eine rund 25 % geringere Radioaktivität als das C-Atom 2.Dieser Befund läßt sich nur damit erklären,daß während des ersten Teils des Abbaus auch ein Teil der Position 1 zur Carboxylgruppe weiteroxydiert wurde. Für diese Annahme

Angebotene Glucose / Aufarbeitungsschritte	Radioaktivität in ipm Glucose- U-^{14}C	1-^{14}C	6-^{14}C	2-^{14}C
Zum Ninhydrin-Abbau eingesetzte AEP	51.955	55.462	71.030	58.030
Erhaltene und zum Abbau kommende Essigsäure	2.750	1.835	5.540	4.800
Methylgruppe der Essigsäure (= C-1 von AEP)	1.107	1.394	4.420	288
Carboxylgruppe der Essigsäure (= C-2 von AEP)	1.540	429	1.105	4.500

Tabelle 10. Verteilung der Radioaktivität in den beiden C-Atomen der Essigsäure nach dem chemischen Abbau der aus Tetrahymena nach Verfütterung positionsmarkierter Glucosen isolierten 2-AEP.

spricht auch jene Beobachtung, nach der ein Großteil der Radioaktivität nach der Oxydation des Acetaldehyds in Form von Ba-Carbonat aus der angeschlossenen Falle mit NaOH gefällt werden konnte.Es ist deshalb anzunehmen,daß im Laufe des ersten Teils des Abbaus ein Teil des Acetaldehyds zur Oxalsäure weiteroxydiert wurde und, solange das Oxydationsmittel noch kräftig war,sich diese unter CO_2-Bildung zersetzte,während sie später zu einem gewissen Teil neben der Essigsäure erhalten blieb. Bei der Wasserdampfdestillation zur Isolierung der Essigsäure geht Oxalsäure ebenso mit über, da sich

beide Substanzen auf diese Weise nicht trennen lassen[42], und wird beim Schmidt-Abbau mit erfaßt, da sie selbst gegenüber konzentrierter Schwefelsäure relativ beständig ist und sich erst beim Erhitzen zersetzt[43]. Eine Trennung durch Säulenchromatographie oder Ausfällen der Oxalsäure als Calciumoxalat wäre zwar möglich, wurde jedoch nicht versucht, da sich die Verfälschung der Ergebnisse in erträglichen Grenzen hält.

Eine Korrektur der Ergebnisse aus Tabelle 10, wie sie sich nach der Radioaktivitätsverteilung bei der aus Glucose-U-^{14}C entstandenen AEP anbietet, würde das Hervorgehen der einzelnen Positionen der AEP aus den jeweiligen C-Atomen der Glucose noch deutlicher unterstreichen. Selbst wenn man aber die 20 %ige Verschmierung unkorrigiert betrachtet, ist der Unterschied in der Aktivitätsverteilung innerhalb der AEP nach Verfütterung der positionsmarkierten Glucosen noch so groß, daß die Herkunft der beiden C-Atome der AEP aus spezifischen C-Atomen der Glucose eindeutig ist.

Wie Tabelle 10 zeigt, ist nach Verfütterung von Glucose-1-^{14}C und -6-^{14}C die Radioaktivität zu 76 bzw. 80 % in der Methylgruppe, nach Verfütterung von Glucose-2-^{14}C dagegen zu 93 % in der Carboxylgruppe der aus AEP entstandenen Essigsäure lokalisiert. Danach entstehen aus den C-Atomen 1 und 6 der Glucose das C-Atom 1 der AEP und aus dem C-2 der Glucose das C-Atom 2 der AEP.

In der Regel ist es sinnvoll und wünschenswert, die Radioaktivität der einzelnen Positionen in Form von spezifischen Aktivitäten anzugeben. Das ist im vorliegenden Falle jedoch nicht möglich, da die Ergebnisse durch andere, aus dem Lösungsmittel entstandene Oxydationsprodukte, die in den Abbau mit eingehen, sehr stark verzerrt werden und die spezifischen Aktivitäten gegenüber den Ausgangswerten um einen Faktor von über 100 niedriger lagen, was normalerweise selbst bei niedrigen Ausbeuten nicht der Fall ist. Auch die zu erwartende Stöchiometrie von 1 : 1 zwischen CO_2 und Methylamin wurde nicht annähernd erreicht, während der Schmidt-Abbau mit reinem Acetat stets eine solche Stöchiometrie lieferte. Aus diesem Grunde wurden in Tabelle 10 nur die Absolutaktivitäten angegeben, zumal sich aus diesen durchaus eindeutige Schlüsse

ziehen lassen.

5. Untersuchungen zur Biosynthese von AEP mit zellfreien Präparationen von Tetrahymena pyriformis.

5.1. Allgemeines

Die in-vitro-Untersuchungen zur Biosynthese von AEP, die in diesem Abschnitt beschrieben werden, wurden mit Rohhomogenaten von Tetrahymena durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die Kulturen 48 Stunden bei 37°C im Standardmedium angezogen, 10 Minuten bei 1.200 g zentrifugiert und die etwa 5 ml Zellen in 5 ml 0,04 M Phosphatpuffer p_H 7,6 mit 0,01 M $MgCl_2$ aufgenommen. Je nach den Versuchsbedingungen, die in den Legenden der jeweiligen Tabellen beschrieben sind, erfolgten weitere Zusätze; oder die Zellsuspensionen wurden sofort nach Auffüllen auf 10 ml mit Wasser 2 Minuten im Bühler-Homogenisator bei Höchstgeschwindigkeit zerschlagen und 5 ml dieses Homogenats in die Ansätze mit den entsprechenden Zusätzen gegeben. Nach zweistündiger Inkubation der Ansätze unter Luft bei 30°C erfolgte die weitere Aufarbeitung nach der Standardmethode.

5.2. Untersuchungen zum Glucoseeinbau in AEP mit zellfreien Präparationen.

Auf Grund des guten Einbaus von Glucose in AEP durch den intakten Organismus lag es nahe, beim Arbeiten mit dem zellfreien System zunächst einmal zu versuchen, einen Einbau von Glucose in AEP zu erreichen.

In einer Reihe von Experimenten wurde daher versucht, ein einigermaßen gut einbauendes System auszuarbeiten. Dabei zeigte es sich, daß es beim Arbeiten mit Glucose unbedingt notwendig ist, beim Homogenisieren der Zellen Sulfhydrylverbindungen wie Glutathion (GSH) zuzusetzen.

Erste Anzeichen dafür, daß der Ansatz mit Glutathion bessere Ergebnisse erbringt, lieferte das Elutionsdiagramm der Kationenaustauschersäule. Zwar ist der Peak mit den AEP-enthaltenden Fraktionen nicht wesentlich höher als beim Ansatz ohne Sulfhydrylzusatz, doch zeigt das Diagramm deutlich, daß Glucose bei Sulfhydrylzusatz besser metabolisiert wurde. In Tabelle 11 ist der Einfluß von Sulfhydrylverbindungen auf den Glucoseeinbau in AEP durch zellfreie Präparationen zusammengefaßt. Dabei zeigt sich, daß die in Frage kommende Fraktion des Ansatzes ohne Sulfhydrylzusatz beim Homogenisieren schon nach der zweiten Umkristallisation in ihrer spezifischen Aktivität praktisch auf den Nullwert abgefallen ist, während sie bei den Ansätzen mit Sulfhydrylzusatz von der zweiten Umkristallisation an praktisch konstant bleibt.

Zusatz		Fraktionen der Dowex-1-Säule + Träger	Nach 1 Umkristallisationen	2	3
plus Glutathion	Menge in mg	36,4	23,0	9,8	2,15
	Radioakt.(ipm)	107.140	1.270	343	68
	ipm / mg	2.945	55	35	32
kein	Menge in mg	40,0	27,6	20,1	--
	Radioakt.(ipm)	266.400	960	40	--
	ipm / mg	6.600	35	2	--

Tabelle 11. Spezifische Aktivität von AEP nach mehrfacher Umkristallisation und Wirkung von Sulfhydrylverbindungen auf den Glucoseeinbau in AEP durch zellfreie Präparationen. Die Zellen wurden wie beschrieben angezogen und aufgearbeitet. Homogenisiert wurde mit und ohne Zusatz von GSH. Der Ansatz enthielt in 5,2 ml Gesamtvolumen in µM: ATP 50; Phosphat 200; $MgCl_2$ 50; Glucose 10 und - sofern angegeben - GSH 100.

Dies ist ein eindeutiger Beweis dafür, daß in diesem Ansatz AEP entstanden ist.

Aus den Werten in Tabelle 11 läßt sich ohne Schwierigkeiten auf den Gesamteinbau von Glucose durch das Homogenat zurückrechnen,da bei der Umkristallisation bekannte Mengen Träger-AEP zugesetzt wurden.Die errechneten Werte ergeben einen Einbau von 580 pM (10^{-12} M) Glucose in AEP.Die Menge ist außerordentlich gering und reicht für Abbauten der entstandenen AEP nicht aus,doch sollte es möglich sein,durch weitere Verbesserungen des Systems die Einbauraten so weit zu erhöhen, daß auch hier ein Abbau möglich ist.

Der Einwand, der geringe Einbau von Glucose in AEP durch das Homogenat sei durch noch vorhandene intakte Zellen erfolgt,dürfte unberechtigt sein. Nach der angewandten Behandlung dürften sich kaum noch ganze Zellen im Homogenat finden, da die Organismen selbst schon durch scharfes Zentrifugieren sehr stark geschädigt werden. Außerdem konnten beim Prüfen des Homogenats unter dem Mikroskop keine intakten Zellen mehr festgestellt werden.

5,3. Untersuchungen zum Serineinbau in AEP mit zellfreien Präparationen.

Die Arbeiten mit Serin am intakten Organismus haben gezeigt, daß Serin nur in sehr geringem Umfang aufgenommen und nicht in AEP eingebaut wird.Durch das Arbeiten mit zellfreien Präparationen wird das Problem der Aufnahme von Serin durch den Organismus umgangen.

Da Serin, sofern es als Vorläufer für die AEP-Synthese dient,jenseits jener kritischen Stelle in der Glycolysekette steht,wo Sulfhydrylgruppen eine essentielle Bedeutung haben, wurde zunächst auf einen Zusatz von Sulfhydrylverbindungen bei der Herstellung der zellfreien Präparationen verzichtet. Die Präparation erfolgte sonst wie bei den Glucoseansätzen, nur wurde Glucose im Ansatz durch 20 µM Serin ersetzt.

Wie aus Tabelle 12 hervorgeht, konnte unter diesen Bedingungen ein Einbau von Serin in AEP erzielt werden. Weiter

geht aus den angeführten Werten hervor, daß die AEP nach der Dowex-1-Fraktionierung zunächst noch sehr viel nichtumgesetztes Serin als Begleitsubstanz enthält, was sich nicht leicht vermeiden läßt, da Serin und AEP unmittelbar nacheinander von der Anionenaustauschersäule eluiert werden. Es zeigt sich aber, daß die Fremdaktivität beim Umkristallisieren sehr schnell abnimmt und von der dritten Umkristallisation ab die spezifische Aktivität konstant bleibt. Aus den Werten der Tabelle 12 errechnet sich ein Einbau von 44,2 nM Serin in AEP, der im Vergleich zu den Glucoseeinbauraten relativ hoch ist.

	Fraktionen der Dowex-1-Säule + Träger	Nach 1 Umkristallisation	2	3	4	5
Menge in mg	50,0	41,6	29,2	24,0	14,0	8,5
Radioakt.(ipm)	2.443.510	283.432	16.086	8.436	4.950	2.964
ipm / mg	488.702	68.133	551	351	354	349

Tabelle 12. Spezifische Aktivität von AEP bei mehrfacher Umkristallisation nach Einbau von Serin durch zellfreie Präparationen. Die Bedingungen sind die zu Beginn des Kapitels beschriebenen. Der Ansatz ist der gleiche wie unter Tabelle 11, nur wurde Glucose durch 20 µM Serin ersetzt und GSH weggelassen.

Eine Zusammenstellung der Einbauten von Glucose und Serin durch zellfreie Präparationen von Tetrahymena ist in Tabelle 13 wiedergegeben. Sie ermöglicht einen Vergleich zwischen dem Einbau der beiden Substrate. Die Zusammenstellung zeigt, daß Serin etwa 38-mal besser als Glucose in AEP eingebaut wurde, so daß Serin zweifellos ein Vorläufer in der Synthesekette ist. Wegen der schlechten Ausbeuten des Abbaus mit Ninhydrin-Dichromat reichen die Aktivitäten nach der vierten Umkristal-

lisation jedoch nicht mehr aus,um einen Abbau zu ermöglichen,

Substrat	Angebot (nM)	Einbau (nM)	Prozent des Angebots
Glucose	10.000 ($2{,}1 \cdot 10^7$ ipm)	0,58	0,0058
Serin	20.000 ($2{,}5 \cdot 10^7$ ipm)	44,2	0,221

Tabelle 13. Vergleich zwischen den Einbauraten von Serin und Glucose durch zellfreie Präparationen in AEP.

so daß bei späteren Arbeiten mit wesentlich höheren spezifischen Aktivitäten gearbeitet werden muß, um einen Abbau der gebildeten AEP zur Klärung der Radioaktivitätsverteilung durchführen zu können.

5,4. Untersuchungen zum Äthanolamineinbau in AEP durch zellfreie Präparationen.

Sollten die Überlegungen von Segal[32] zutreffen, daß die AEP-Biosynthese über ein Rearrangement von Phosphatidyläthanolamin erfolgt,so sollte es auch möglich sein,diese Verbindung einzubauen. Fütterungsversuche am intakten Organismus waren daran gescheitert, daß Äthanolamin nicht von Tetrahymena aufgenommen wird. Die Anzucht der Kulturen zur Herstellung der zellfreien Präparationen erfolgte unter Standardbedingungen (Tabelle 2, Seite 10).

Zur Herstellung des Homogenats werden die zentrifugierten Zellen in 4 ml Tris-HCl Puffer p_H 7,6 (0,6 mM),$MgCl_2$ (0,3 mM) und GSH (0,2 mM) suspendiert und 2 Minuten im Bühler-Homogenisator bei Höchstgeschwindigkeit zerschlagen. In den Testansatz wird soviel Homogenat gegeben, daß dieser in /uM folgende Zusammensetzung in einem Gesamtvolumen von 5,3 ml erhält : Tris-HCl p_H 7,6 300; $MgCl_2$ 150; GSH 100; Äthanolamin 10 (0,02 mC); ATP 50; CDP 10; CTP 9.Inkubation 2 Stunden bei

30°C unter Luft.

Das Elutionsdiagramm der Kationenaustauschersäule zeigt, daß ein Teil des Äthanolamins metabolisiert wurde, der weitaus größte Teil jedoch unverändert von der Säule eluiert wird. Die AEP-enthaltenden Fraktionen zeigen ebenfalls Radioaktivität; diese ist jedoch zu gering,um eine Säulenchromatographie an Dowex-1-Ac zu ermöglichen.Die Fraktionen wurden daher vereinigt, am Rotationsverdampfer eingedampft und auf Schleicher & Schüll 2040 B chromatographiert und die Radioaktivität mit dem Dünnschicht-Scanner lokalisiert.Es treten dabei einige Peaks auf, von denen einer mit AEP übereinstimmt (Abb. 10). Die Aktivität ist jedoch zu gering,als daß eine Rechromatographie in anderen Laufmitteln oder Umkristallisationen zur endgültigen Identifizierung möglich wären.

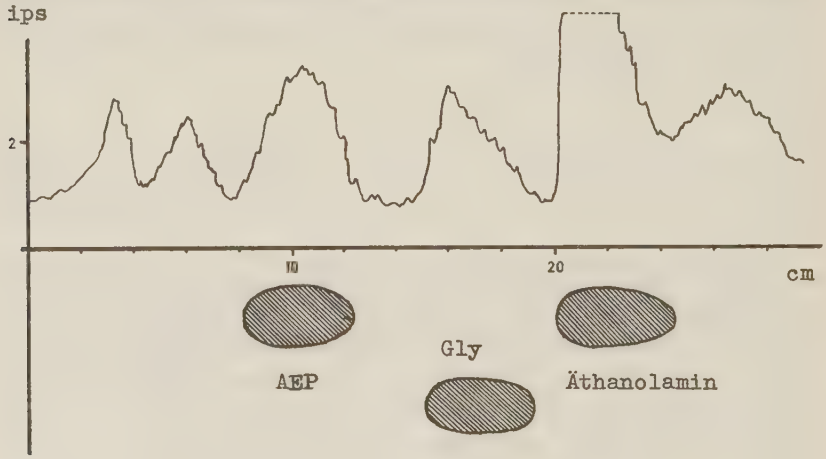


Abb. 10 Chromatographie der Fraktionen 26 - 37 der Kationenaustauschersäule in Phenol - Wasser (80 : 20).

Der geringe, wenn überhaupt erfolgte Einbau dürfte darauf zurückzuführen sein,daß Äthanolamin zur Bildung von Phosphatidyläthanolamin unbedingt ein Diglycerid als Acceptor für den Äthanolaminphosphat - Teil des CDP-Äthanolamins benötigt,

während Serin das Äthanolamin des Cephalins einfach zu substituieren vermag.Ein Fehlen freier Diglyceride im Homogenat würde den fehlenden Einbau einigermaßen verständlich machen, da dem Ansatz keine Diglyceride zugesetzt wurden.

III. Diskussion

Das Vorkommen von 2-Aminoäthylphosphonsäure (AEP) sowie anderer Phosphonoverbindungen in biologischem Material konnte durch deren Isolierung und Charakterisierung aus einer Vielzahl von Organismen gesichert werden[1-12,25], doch liegen über die Rolle dieser Verbindungen im Organismus bisher keinerlei Informationen vor. Auch über die Biosynthese dieser neuen Verbindungsklasse gibt es trotz der zahlreichen Arbeiten über das Vorkommen[1-12,25] und den Einbau von gefütterter AEP in Phospholipide unter anderem durch Musca domestica[27] und Ratten[30] nur spärliche Informationen. In vorliegender Arbeit wurde daher versucht, den Biosyntheseweg für AEP durch Einsetzen verschiedener Vorläufer etwas näher zu untersuchen und die Herkunft des C-Gerüstes zu klären.

Untersuchungen mit ^{32}Phosphat können zunächst nicht viel zur Klärung des Problems der AEP-Biosynthese beitragen; denn die faßbaren ^{32}P-markierten Verbindungen sind entweder bereits Phosphonosäuren oder die bekannten Zuckerphosphate, Nucleotide und Phospholipide, deren Beziehung zu den Phosphonosäuren noch völlig unbekannt ist. ^{32}Phosphat leistet andererseits wertvolle Hilfe bei der Zuordnung der AEP zu verschiedenen Fraktionen wie Lipiden, Proteinen oder löslicher AEP, ferner beim Auffinden weiterer Phosphonosäuren, beim Festlegen der günstigsten physiologischen Bedingungen für die Biosynthese von AEP und beim Ausarbeiten der Methodik zu ihrer Isolierung.

Da die eigentlichen Biosyntheseversuche mit Hilfe ^{14}C-markierter Verbindungen, insbesondere mit Glucose durchgeführt werden sollten, war es nötig, das übliche Anzuchtmedium mit dem Ziel zu ändern, die Glucose im Medium zu ersetzen. Unter den hier angewandten Bedingungen war ein Ersatz der Glucose durch andere organische Substrate nicht möglich. Durch Anwendung von ^{32}Phosphat ergibt sich, in welchem Umfange die Glucosemenge reduziert werden kann, ohne den AEP-Gehalt zu drastisch zu senken. Die Ergebnisse zeigen, daß die Glucosegabe bis auf etwa 12 % der Normalkonzentration reduziert werden

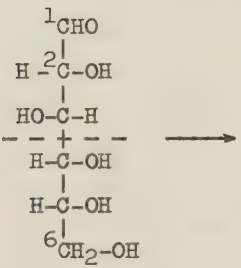
kann, doch werden unter diesen Bedingungen die von Kandatsu und Horiguchi[2] ermittelten Spitzenwerte von 13 und mehr Prozent des von den Zellen aufgenommenen Phosphats in AEP nicht erreicht. Der hier gefundene Einbau von 3 - 6 % reicht jedoch für unsere Zwecke aus.

Da im Hinblick auf die Versuche mit ^{14}C - markierten Substraten der Standardisierung der Isolierungsmethodik große Bedeutung zukommt, wurde zu deren Ausarbeitung ebenfalls ^{32}Phosphat angewendet.Es zeigte sich,daß durch Anwendung von Ionenaustauschersäulenchromatographie und Umkristallisation reine AEP isoliert werden kann.Als Reinheitskriterien gelten sowohl konstante spezifische Radioaktivität als auch Reinheit bei zweidimensionaler Papierchromatographie.Während bei den ^{32}P - Versuchen die spezifische Radioaktivität nach der Fraktionierung der AEP an der Anionenaustauschersäule konstant bleibt und noch vorhandene Verunreinigungen nur im Papierchromatogramm durch Anfärbung mit Ninhydrin festzustellen sind,gehen bei den ^{14}C-Versuchen das Erreichen der konstanten spezifischen Aktivität nach mehrfacher Umkristallisation und das Verschwinden der Verunreinigungen Hand in Hand. Die Methodik konnte demnach genügend standardisiert werden,um auch bei den ^{14}C - Versuchen, bei denen eine Kontrolle durch die ^{32}P-Markierung wegfällt,reine AEP zu isolieren.Es gelang bei den ^{14}C - Versuchen wegen der Vielzahl der in diesem Bereich auftretenden markierten Verbindungen jedoch nicht, die bei den ^{32}P-Versuchen sehr einfach abzutrennende 2-Amino-3-Phosphono-Propionsäure (APP) zu isolieren.

Die Verfütterung positionsmarkierter Glucosen, ihr Einbau in AEP und deren Abbau zur Ermittlung der Radioaktivitätsverteilung lieferte ein eindeutiges Ergebnis. Nach Verfütterung von Glucose-1-^{14}C und Glucose-6-^{14}C ist die Radioaktivität zu 76 bzw. 80 % in der Methylgruppe, nach Verfütterung von Glucose-2-^{14}C dagegen zu 93 % in der Carboxylgruppe der aus AEP erhaltenen Essigsäure lokalisiert. Das C-1 der AEP entsteht also aus den C - Atomen 1 und 6, das C-2 aus dem C-2 der Glucose (Schema II.).

Die Klärung der Herkunft der beiden C-Atome der AEP er-

laubt es, eine Reihe von denkbaren Biosynthesewegen auszuschließen. Die Ergebnisse stehen jedoch mit der Annahme in



$^{1}CH_2 - PO_3H_2$	76 %	bei Glucose-1-^{14}C
$^{2}CH_2 - NH_2$	93 %	bei Glucose-2-^{14}C
$^{2}CH_2 - NH_2$		
$^{1}CH_2 - PO_3H_2$	80 %	bei Glucose-6-^{14}C

Schema II. Verteilung der Radioaktivität in AEP nach Verfütterung positionsmarkierter Glucosen.

Übereinstimmung, daß AEP durch Umlagerung aus einem C_3-Körper hervorgeht, der in der üblichen Weise aus dem glycolytischen Abbau der Glucose entsteht.

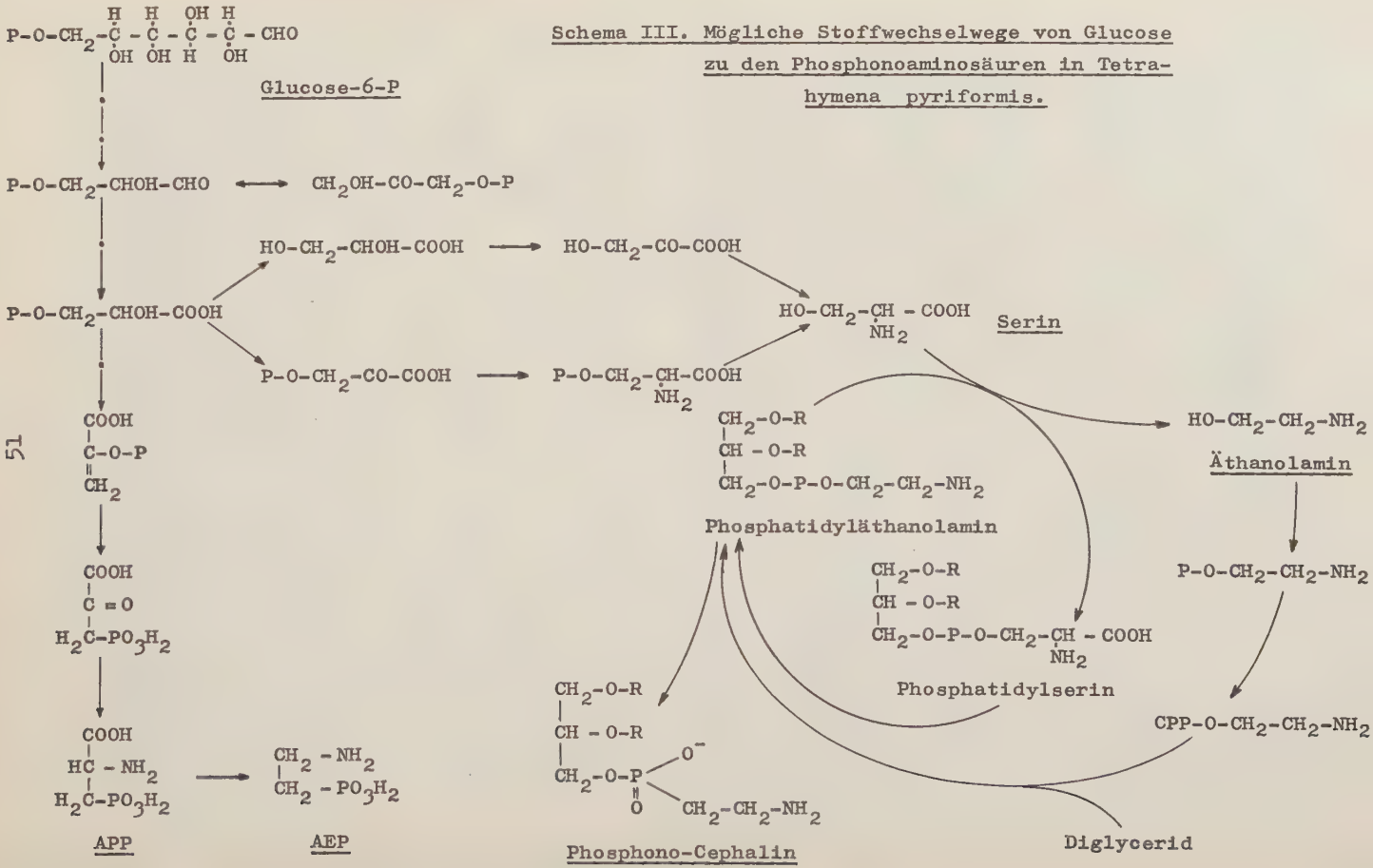
Nach einer theoretischen Arbeit von Segal[32] erscheinen für die Biosynthese von AEP zwei Wege am wahrscheinlichsten, die beide mit den erhaltenen Ergebnissen vollkommen übereinstimmen.

1. Der Umlagerung von Phosphoenolpyruvat (PEP) zu 2-Keto-3-Phosphono-Propionsäure (KPP, Phosphonopyruvat), Transaminierung zu 2-Amino-3-Phosphono-Propionsäure (APP) und deren Decarboxylierung zu AEP.
2. Der Umlagerung von Phosphatidyläthanolamin bzw. -Serin zu Lipid-gebundener AEP bzw. APP.

Diese beiden möglichen Biosyntheserouten für AEP aus Glucose sind in Schema III wiedergegeben.

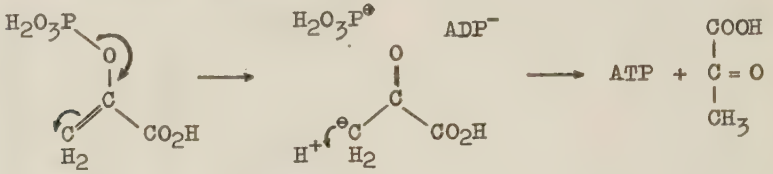
Der Weg 1 erscheint aus mechanistischen Gründen als der weitaus einfachere, zumal PEP in einer ganzen Reihe von Enzymreaktionen unter scheinbarer Abspaltung eines "Metaphosphats" reagiert. Dabei kommt es am C-3 zur Ausbildung eines Carban-

Schema III. Mögliche Stoffwechselwege von Glucose zu den Phosphonoaminosäuren in Tetrahymena pyriformis.

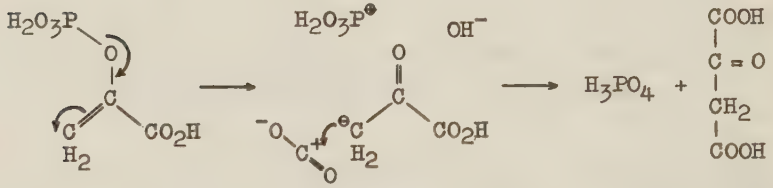


ions, das in zahlreichen Reaktionen als Nucleophil reagiert. Nach diesem Mechanismus laufen z.B. die Pyruvat-Kinase- (1.), die PEP-Carboxylase- (2.) und die 3-Deoxy-D-Arabino-Heptulosonat-7-P-Synthase-Reaktion ab.

1.



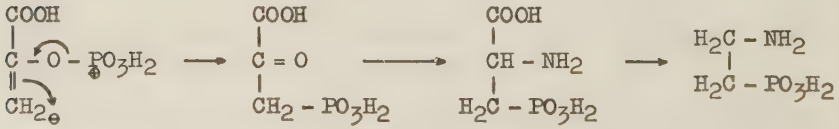
2.



Alle diese Reaktionen laufen, wie die Formeln zeigen, nach dem gleichen Schema ab: Stets reagiert das Carbanion mit einer positiven Gruppe, die entweder ein Proton oder das positivierte C-Atom einer aufgerichteten C=O-Doppelbindung - wie z.B. CO_2 oder die Aldehydgruppe des Erythrose-4-P - sein kann. Es erscheint daher durchaus möglich, daß auch eine Reaktion zwischen dem Carbanion und dem positivierten "Metaphosphat" des PEP stattfinden kann.

Die Umlagerung des PEP zum Phosphonopyruvat könnte auf zwei Arten erfolgen:

1. Intramolekular

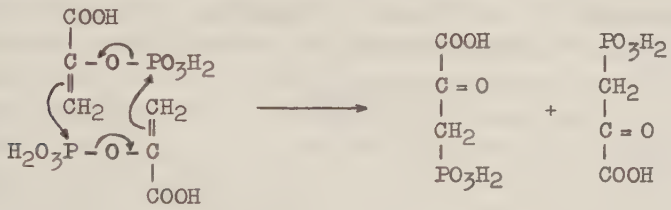


PEP — 2-Keto-3-Phospho-no-Propionsäure — APP — AEP

und

2. wäre ein intermolekularer Phosphataustausch möglich.

In Analogie zu den genannten Reaktionen, wo es stets zu einem nucleophilen Angriff auf das PEP - sei es durch OH^- oder ADP^- - kommt, wäre eine intermolekulare Umlagerung wahrscheinlicher als eine intramolekulare. Vor allem würde in diesem Fall das Argument von Segal[32] gegen diesen Biosyntheseweg, der Phosphor sei nicht positiv genug und könne zu leicht abdissoziieren, entkräftet.

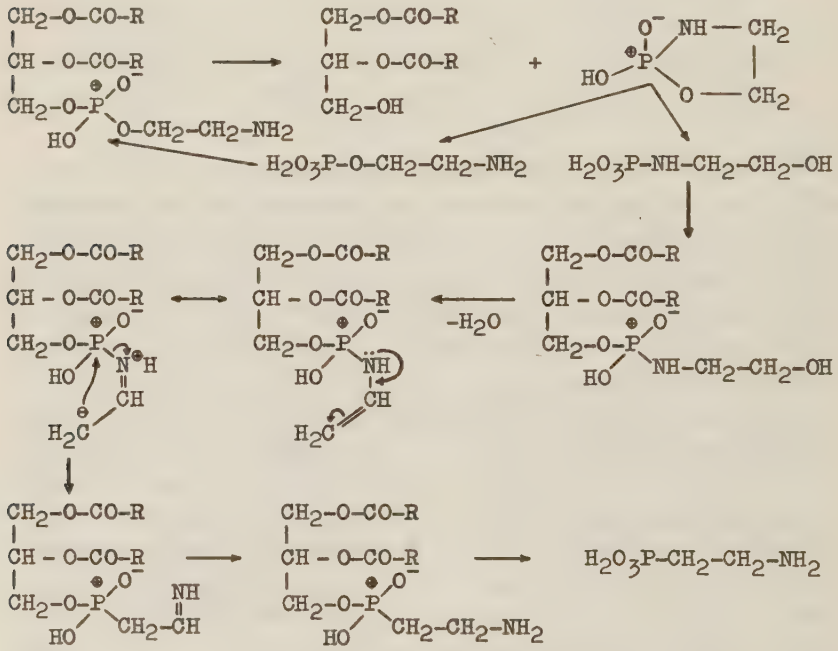


Der Weg 2 hat dagegen einen Mechanismus, der recht kompliziert ist und auf den ersten Blick unübersichtlich erscheint. Sich für diesen Weg zu entscheiden, wird besonders dadurch erschwert, daß bisher noch keine biochemische Analogiereaktion bekannt wurde. Trotzdem spricht sich Segal[32] für diesen Weg aus, da er durch eine Reihe von Befunden eine gewisse Stützung findet.

Zahlreiche Untersuchungen haben gezeigt, daß AEP vor allem in Lipiden vorkommt[3-6,8,9,11,25] und dort Äthanolamin - Phosphat teilweise ersetzt, so daß man AEP als Analogon dieser Verbindung betrachten sollte und die scheinbare Analogie zu ß-Alanin irreführend ist. Kinetikuntersuchungen von Rosenberg[3] zeigten, daß bei Fütterung von ^{32}Phosphat Lipid-gebundene AEP sehr schnell markiert ist, während die Markierung in freier AEP nur sehr langsam ansteigt. Eingehendere Untersuchungen zu dieser Frage ergaben, daß die spezifische Aktivität der freien AEP wesentlich niedriger ist als die der Lipid-gebundenen[31]. Vor allem auf Grund dieser Ergebnisse[3,31] sowie der Tatsache, daß AEP in erster Linie in Lipiden anzutreffen ist, erscheint es durchaus möglich, daß die Biosynthese dieser Verbindung an Lipiden abläuft, obwohl das Vorkommen in Lipiden allein noch kein stichhaltiger Grund für die Annahme ei-

ner Biosynthese von AEP an Lipidvorläufern ist, wie der unspezifische Einbau dieser Substanz in Lipide[27,30] zeigt.

Die Kinetikuntersuchungen von Rosenberg[3], das Nebeneinandervorkommen von AEP und Äthanolamin in den Lipidfraktionen sowie die Eigenschaften von Phospholipiden, Ribonucleinsäuren und geeigneten Modellverbindungen, auf die hier jedoch nicht näher eingegangen werden soll, führten Segal[32] dazu, Phosphatidyläthanolamin als unmittelbaren Vorläufer von AEP anzusehen. Der von ihm angenommene Mechanismus, der in Schema IV wiedergegeben ist, nimmt eine Umlagerung von Phosphatidyläthanolamin zum Phosphono-Analogon von Cephalin an. Der Mecha-



Schema IV. Biosynthese von AEP aus Phosphatidyläthanolamin.

nismus beruht jedoch nur auf theoretischen Überlegungen, die auf verschiedenen Phosphatumlagerungen bei natürlich vorkommenden Verbindungen nach Behandlung mit Chemikalien sowie auf dem Verhalten von Modellverbindungen gegründet sind und

konnte bisher nicht durch Experimente untermauert werden.Die Ergebnisse dieser Arbeit stehen jedoch auch mit diesem Weg 2 im Einklang.

Aus dem gemeinsamen Vorkommen von AEP und APP in Tetrahymena und Zoanthus sociatus[4] und der Analogie zwischen APP und AEP auf der einen und Serin und Äthanolamin auf der anderen Seite hält Segal[32] einen gemeinsamen Biosyntheseweg der beiden Phosphonosäuren für möglich.APP wäre danach Vorläufer von AEP und entstünde auf die gleiche Weise aus Phosphatidylserin wie AEP aus Phosphatidyläthanolamin. Dieser Schluß erscheint allerdings etwas verfrüht, da neuere Ergebnisse[4,31] eher gegen diese Vorläuferzusammenhänge sprechen. Lipid-gebundene AEP besitzt eine wesentlich höhere spezifische Aktivität als APP, die außerdem noch in größeren Mengen in Proteinbindung vorzuliegen scheint[4]. APP könnte theoretisch jedoch ähnlich den Vorläuferzusammenhängen zwischen Serin und Äthanolamin sowie Phosphoserin und Phosphoryl-Äthanolamin[44] Vorläufer für freie AEP sein, deren spezifische Aktivität ebenfalls sehr niedrig ist[31].

Zur Entscheidung darüber, welcher der beiden hier diskutierten möglichen Biosynthesewege verwirklicht wurde,erfolgten Einbauversuche mit Serin, wodurch gleichzeitig geklärt würde,ob APP ebenfalls über die postulierte Umlagerung[32] entsteht und damit Vorläufer für AEP ist oder nicht.

Serin ist der unmittelbare Vorläufer von Phosphatidylserin, das direkt aus Phosphatidyläthanolamin durch Austausch des Äthanolaminteils gegen Serin unter Mitwirkung von Ca^{2+}-Ionen entsteht und unter Decarboxylierung in Phosphatidyläthanolamin überführt werden kann[48]. Vor allem beim Arbeiten mit zellfreien Präparationen ist es sehr vorteilhaft,daß Serin an die Stelle des Äthanolaminteils im Cephalin treten kann, da dann der Einbau vom Vorhandensein von Diglyceriden unabhängig ist,denn der intakte Organismus vermag weder Serin noch Äthanolamin aus dem Medium aufzunehmen und Cephalin dürfte im Gegensatz zu freien Diglyceriden in größeren Mengen im Homogenat vorhanden sein.Dies zeigt sich vor allem an den bisherigen Ergebnissen mit zellfreien Präparationen, die mit Serin-^{14}C einen relativ guten, mit Äthanolamin-^{14}C hin-

gegen, wenn überhaupt, so nur einen sehr geringen Einbau in AEP erbrachten. Ein Einbau von Serin in AEP mit Homogenaten konnte dagegen nicht festgestellt werden.

Der äußerst geringe, wenn überhaupt erfolgte Einbau von Äthanolamin in AEP könnte auf zweierlei Gründe zurückzuführen sein. Die naheliegendste Deutung dieses Ergebnisses beruhte auf der Annahme eines weitgehenden Fehlens von freien Diglyceriden als Acceptor für den Äthanolamin-Phosphat-Teil des CDP-Äthanolamins, wodurch die Synthese von Phosphatidyläthanolamin, an dem die Umlagerung erfolgen soll[32], unmöglich wäre. Die zweite Interpretation dieser Befunde würde das von Segal vorgeschlagene Schema zur AEP - Biosynthese leicht abwandeln und eine Umlagerung von Phosphatidylserin unter simultaner Decarboxylierung annehmen.

Die nächsten Schritte zur Aufklärung der Biosynthese der AEP müßten sich darauf konzentrieren zu klären, ob Phosphatidyläthanolamin und -serin in zellfreien Extrakten eine Umlagerung zum Phosphono-Analogon von Cephalin erfahren. Vergleichende Untersuchungen über den Einbau von Phosphoglycerinsäure (PGS), der Verbindung am Verzweigungspunkt zu den beiden zur Diskussion stehenden Biosynthesewegen (Schema III), sowie PEP dürften ebenfalls zur weiteren Klärung des Problems beitragen und die Frage entscheiden, ob für die beiden Phosphonosäuren zwei getrennte Biosynthesewege existieren oder nicht und welcher der beiden möglichen vom Organismus verwirklicht wurde. Auf Grund der Ergebnisse vorliegender Arbeit ist diese Entscheidung nicht mit Sicherheit zu treffen, obwohl der Einbau von Serin den zweiten wahrscheinlicher erscheinen läßt.

Zwar gelang Liang und Rosenberg[26] im zellfreien System von Tetrahymena die Biosynthese des Phosphono - Analogons von Cephalin, doch wird dadurch das Problem der AEP - Biosynthese nicht gelöst, da AEP vorgegeben wurde. Die Arbeiten sind jedoch insofern interessant als sie zeigen, daß AEP über die gleiche Reaktionsfolge, die zum Einbau von Äthanolamin in Cephalin führt[45], in Phosphono-Cephalin eingebaut wird und als Nucleotid ebenfalls ausschließlich CTP verwendet wird[26]. Dieser Reaktionsablauf beweist jedoch nicht die Spezifität dieses Bio-

syntheseweges für AEP, da schon mehrfach gezeigt wurde, daß diese Reaktion im Hinblick auf die Base unspezifisch ist und Äthanolamin - Phosphat einfach durch AEP bei der Synthese von Cephalin ersetzt wird[27,46].Diese Synthese liefert jedoch bei Verwendung doppeltmarkierter AEP die Möglichkeit einer Untersuchung darüber, ob eine Rückumlagerung zum Cephalin erfolgt, die theoretisch möglich sein sollte.

IV. Methodik

1. Anzucht und Inkubation der Kulturen von Tetrahymena.

Alle Versuche zur Biosynthese der Phosphonoaminosäuren wurden mit Tetrahymena pyriformis Wh 14 aus der Algensammlung des Pflanzenphysiologischen Instituts der Universität Göttingen durchgeführt+).

Für die meisten Versuche wurden größere Mengen Zellen benötigt, so daß Tetrahymena in großen Ansätzen in 1-Ltr-Erlenmeyerkolben angezogen werden mußte. Die Mediumszusammensetzung richtete sich nach den Anforderungen der Versuche und ist in den Tabellen 1 und 2 (Seite 7 bzw. 10) angegeben.

Die Anzucht erfolgte in 1-Ltr-Erlenmeyerkolben mit 300 ml Kulturmedium, das im Normalfall 6 g Difco Proteose - Pepton, 1,5 g Difco Yeast-Extrakt und 2,5 g Glucose enthält, die zusammen autoklaviert wurden. In dieses Medium wird unter sterilen Bedingungen eine 10-ml-Stammkultur eingeimpft und 48 Stunden bei 37°C unter ständigem langsamen Rühren mit einem Magnetrührer bebrütet.

Bei den Wachstumsexperimenten werden die Kulturen in entsprechend kleineren Ansätzen mit den dort angegebenen Mediumszusammensetzungen (Tab. 1, Seite 7) in der gleichen Weise wie die Massenkulturen inkubiert.

Bei Arbeiten mit radioaktiven Substraten erfolgt die Anzucht der Kulturen in einem Nährmedium, das wie beim Normalansatz vorbereitet wurde, dessen Glucosemenge jedoch auf 0,6 g vermindert wurde. Nach 36 Stunden Inkubation werden die Zellen unter sterilen Bedingungen 10 Minuten bei 1.000 g zentrifugiert, in 10 ml sterilem Wasser aufgenommen und in 290 ml autoklaviertem Kulturmedium, das 2 g Proteose-Pepton, 300 mg Hefe - Extrakt und 100 mg Glucose enthält, überführt und 10 Stunden mit dem radioaktiven Substrat - ^{32}Phosphat, ^{14}C-Glucose, -Serin und -Äthanolamin - nachinkubiert.

+) Herrn Dr. W. Koch danke ich herzlichst für die Anleitung bei der Behandlung der Kulturen und für das Überlassen der Stammkulturen.

2. Aufarbeitung der Kulturen.

Die Zellen werden nach der Inkubation mit dem radioaktiven Substrat 15 Minuten bei 2.000 g zentrifugiert, in etwa 250 ml 6 N HCl suspendiert und 24 Stunden bei 110°C am Rückfluß hydrolysiert. Zur Entfernung der Salzsäure aus dem Rohhydrolysat wird mehrfach am Rotationsverdampfer im Wasserstrahlpumpenvakuum bei etwa 40°C bis nahe zur Trockne eingedampft und jeweils mit Wasser aufgenommen. Vor dem letzten Eindampfen wird das Hydrolysat zur Entfernung verkohlter Reste filtriert, diese gut mit Wasser gewaschen und das Filtrat schließlich zur Trockne eingedampft. Das Hydrolysat wird in 10 ml 1 N Ameisensäure aufgenommen und nach Auszählung eines Aliquots auf eine Dowex-50-H^+-Säule (1 x 25 cm) gebracht.

3. Säulenchromatographie des Säurehydrolysats sowie der 2-AEP-Fraktionen.

Das in 1 N Ameisensäure aufgenommene Hydrolysat wird auf eine neutralgewaschene Dowex-50-H^+-Säule (1 x 25 cm) aufgebracht und zweimal mit 5 ml 1 N Ameisensäure eingewaschen. Dann wird mit Wasser weitereluiert und Fraktionen von 5 ml gesammelt. Ab Fraktion 21 wird das Wasser im Vorratsgefäß durch 0,6 N HCl ersetzt und damit weitereluiert. Bei den ^{14}C-Ansätzen werden etwa 60, bei den ^{32}P-Ansätzen etwa 40 Fraktionen gesammelt. Mit 0,6 N HCl erfolgt auch die Regeneration der Säule, danach wird mit Wasser neutralgewaschen.

In einigen ^{32}Phosphat-Versuchen wurde nur mit Wasser eluiert. In diesem Falle wurden insgesamt 100 Fraktionen gesammelt.

Die Dowex-50-Fraktionen mit der gesuchten AEP werden vereinigt, am Rotationsverdampfer zur Trockne eingedampft, mit 5 ml entgastem Wasser aufgenommen und auf eine mit etwa zwei Liter entgastem Wasser neutralgewaschene Dowex-1-Ac-Säule (1 x 32 cm) aufgesetzt, mit zweimal 5 ml entgastem Wasser eingewaschen, mit 10^{-3} N Essigsäure eluiert und 16 5-ml-Fraktionen gesammelt. Die Regeneration der Säule erfolgt mit 1 N Essigsäure. Danach wird mit entgastem Wasser neutralgewaschen.

Von den Fraktionen werden Aliquots zur Bestimmung der Radioaktivität ausgezählt.

4. Messung der Radioaktivität.

Die Messung der Radioaktivität erfolgt mit Aliquots, von denen auf die Gesamtaktivität der Probe umgerechnet werden kann. Bei ^{32}Phosphat - Proben erfolgt die Messung, sofern es sich um Einzelproben handelt, am Endfensterzählrohr, während das Auszählen der Fraktionen mit Hilfe eines automatischen Probenwechslers mit Durchflußzählrohr und Methan als Spülgas durchgeführt wird. Die Proben (0,2 ml) werden auf Aluminium-Plättchen aufgetragen, unter einer Infrarot-Lampe getrocknet und anschließend gezählt.

Die Messung der ^{14}C - Proben erfolgt im Scintillationszähler Nuclear Chicago Mark I bei einer Einstellung, die ein Höchstmaß an Zählausbeuten für das jeweilige Isotop erreicht. Dazu wurden von den einzelnen Fraktionen sofort Aliquots von 0,1 ml in die Zählgläschen pipettiert, mit 5 ml Scintillator-Flüssigkeit nach Bray[47] versetzt und nach mindestens 15 Minuten Abkühlung zur Zählung gebracht. Der Nullstandard wurde stets vorweg gezählt und später automatisch subtrahiert. Die Zählausbeuten betrugen:
Im Endfensterzählrohr für ^{32}P etwa 20 % und für ^{14}C etwa 5 %, im Durchflußzählrohr für ^{32}P ebenfalls etwa 20 % und im Scintillationszähler für ^{14}C 85 - 90 %.

5. Papierchromatographie.

Die Chromatographie erfolgt auf Schleicher & Schüll Papier 2040 B. Im allgemeinen werden folgende Laufmittel benutzt: A) Phenol - Wasser (80 : 20)
B) Butanol - Eisessig - Wasser (52 : 14 : 35)
C) t-Butanol - Methyl-Äthylketon - Ameisensäure - H_2O (10 : 5 : 1 : 10)

Bei zweidimensionaler Chromatographie wurde zunächst im Phenol-System und nachfolgend im Butanol-System chromatographiert. Die Radioaktivität wird bei zweidimensionaler Chroma-

tographie durch Radioautographie (Röntgenfilm Gevaert Structurix D 10) und bei eindimensionaler Chromatographie mit einem Dünnschicht-Scanner (Fa. Berthold, Wildbach) lokalisiert.

6. Reaktion von Ketoverbindungen mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin.

Von der mit Wasser vom Chromatogramm eluierten Verbindung wird ein Aliquot mit 0,5 ml Reaktionslösung versetzt und kurz zum Sieden erhitzt. Die Reaktionslösung besteht aus: 3,3 mg 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 0,1 ml Methanol, 0,735 ml Wasser und 0,165 ml konzentrierter HCl.

7. Reinigung der markierten 2-AEP durch Umkristallisation.

Die in Frage kommenden Fraktionen nach der Dowex-1-Ac-Reinigung werden am Rotationsverdampfer eingedampft, mit wenig Wasser aufgenommen und unter Zusatz von synthetischer Träger-AEP (Calbiochem) in ein graduiertes Zentrifugenglas überführt. Die Lösung wird langsam unter ständigem Schütteln mit Alkohol auf 60% Äthanol gebracht und etwa 3 Stunden bei Zimmertemperatur stehengelassen, wobei sich in der Regel bereits gutausgebildete Kristalle absetzen. Zur weiteren Kristallisation werden die Proben einige Zeit bei etwa 3°C gehalten. Die Kristalle werden auf einer V2A-Stahl-Fritte mit Membranfiltern abgesaugt, mehrfach mit kaltem 60 %igem und schließlich mit kaltem 96 %igem Äthanol nachgewaschen, im Trockenschrank kurz bei 110°C getrocknet und ausgewogen. Die Kristalle werden in 1 ml Wasser gelöst und ein Aliquot, das sich nach der vorhandenen Radioaktivität richtet, zur Aktivitätsmessung verwendet. Mit dem Rest werden weitere Umkristallisationen durchgeführt.

8. Überführung der AEP in Essigsäure nach De Koning.

Die gereinigte AEP-Lösung wird in ein 25-ml-Zweihals-

Spitzkölbchen überführt, am Rotationsverdampfer zur Trockne eingedampft und,wenn nötig,mit weiterer inaktiver Träger-AEP versetzt. 250 mg Ninhydrin werden in 10 ml Methylcellosolve und 10 mg $SnCl_2 \cdot 2\ H_2O$ in 10 ml 0,1 M Succinatpuffer p_H 5,0 gelöst, beide Lösungen werden zusammen der vorbereiteten AEP zugesetzt und anschließend 8 Stunden auf dem siedenden Wasserbad unter einem leichten Stickstoffstrom erhitzt.Über eine Glasbrücke wird der Stickstoffstrom in eine gesättigte Dichromatlösung in 6 N H_2SO_4 geleitet, die ebenfalls auf dem siedenden Wasserbad erhitzt wird.An das Oxydationsgefäß sind noch ein Rückflußkühler und eine Falle mit NaOH angeschlossen. Nach der Beendigung der Reaktion werden sowohl die Produkte im Oxydations- als auch die im Reaktionsgefäß nach Ansäuern in einer Ganzglasapparatur einer Wasserdampfdestillation unterworfen. Das Destillat wird in einer eisgekühlten Vorlage mit 0,1 N NaOH aufgefangen,mit 0,1 N H_2SO_4 gegen Methylrot titriert,am Rotationsverdampfer eingeengt,die Radioaktivität bestimmt und nach Überführung in ein 25-ml-Zweihals-Spitzkölbchen völlig zur Trockne eingedampft.

9. Schmidt-Abbau der Essigsäure zu CO_2 und Methylamin.

Die Essigsäure wird in 0,5 ml konzentrierter Schwefelsäure - gegebenenfalls unter leichtem Erwärmen - gelöst und in Eis gestellt. 100 - 150 mg Na - Azid werden mit 1,5 ml konzentrierter Schwefelsäure versetzt und unter leichtem Erwärmen auf dem Wasserbad ebenfalls in Lösung gebracht. Nach Abkühlung der Azidlösung wird sie ins Reaktionsgefäß zur gekühlten Essigsäurelösung gegeben, der Gaseinleitungsaufsatz mit der Ableitungsvorrichtung aufgesetzt und die beiden Fallen mit 5 % $KMnO_4$ in 1 N H_2SO_4 zur Zerstörung der übergehenden HN_3 bzw. mit 0,1 N NaOH in der angegebenen Reihenfolge angeschlossen, wobei die Schliffe mit Phosphorsäure geschmiert werden. Darauf wird die Apparatur eine Stunde im Eisbad mit CO_2-freiem Stickstoff durchspült und anschließend das Eisbad gegen ein Wasserbad vertauscht.Unter weiterer Stickstoffspülung wird der Reaktionsansatz eine Stunde auf 70°C gehalten.

Nach Beendigung der Reaktion wird noch etwa eine Stunde bei Zimmertemperatur weiter mit Stickstoff gespült.

Das in der NaOH absorbierte CO_2 wird mit einer 0,04 M Lösung von Bariumchlorid - Ammoniumchlorid gefällt, der Niederschlag mit einer V2A - Stahlfritte auf einem Glasfilter abgesaugt, mit CO_2 - freiem Wasser und Alkohol gewaschen, im Exsikkator getrocknet, ausgewogen und am Endfensterzählrohr ausgezählt. Es wird dann in einer Vakuumapparatur durch Zugabe von Phosphorsäure und Auffangen des entstehenden CO_2 in NaOH in Na-Carbonat überführt und im Scintillationszähler nochmals ausgezählt.

Zur Austreibung des beim Schmidt - Abbau entstandenen Methylamins, das sich noch in der Schwefelsäurelösung befindet, werden die Schliffe der Apparatur sorgfältig von der Phosphorsäure befreit und mit Hahnfett gedichtet. Nach Aufsetzen eines Tropftrichters mit konzentrierter NaOH-Lösung und Anschließen einer Falle mit 0,2 N HCl wird die Reaktionslösung durch Einfließen der NaOH-Lösung stark alkalisch gemacht und unter Durchleiten von Stickstoff zwei Stunden auf dem Wasserbad erhitzt. Das Methylamin geht dabei in die Falle über. Die Lösung wird am Rotationsverdampfer eingeengt, in ein Zählgläschen überführt und auf dem siedenden Wasserbad im Stickstoffstrom zur Trockne eingedampft. Nach dem Auswägen werden 5 ml Scintillatorflüssigkeit zugesetzt und die Radioaktivität bestimmt.

10. Herstellung des Rohhomogenats und Inkubationsansätze.

Tetrahymena pyriformis Wh 14 wird 48 Stunden im Normalmedium wie beschrieben angezogen. Der Ansatz wird 10 Minuten bei 1.200 g zentrifugiert und die etwa 5 ml nassen Zellen mit 5 ml 0,04 M Phosphatpuffer p_H 7,6 mit 0,01 M $MgCl_2$ aufgenommen. Nach Zusatz von 0,02 M Glutathion (sofern es sich um die Glucoseansätze handelt) wird auf 10 ml aufgefüllt und 2 Minuten bei Höchstgeschwindigkeit im Bühler - Homogenisator unter Eiskühlung zerschlagen. 5 ml des Homogenats werden für den Inkubationsansatz genommen.

In einem Gesamtvolumen von 5,2 ml enthält der Testansatz in µM: Phosphat p_H 7,6 200; $MgCl_2$ 50; ATP 50; Glucose-^{14}C 10 oder Serin-^{14}C 20; (bei den Glucoseansätzen außerdem noch) Glutathion 100. Für Äthanolaminversuche enthält der Testansatz in µM: Tris-HCl p_H 7,6 300; $MgCl_2$ 150; GSH 100 dazu ATP 50; CDP 10; CTP 9 und Äthanolamin 10. Entsprechend wurde das Homogenisationsmedium verändert. Die Inkubation erfolgt 2 Stunden bei 30°C unter Schütteln in Luft. Nach Beendigung des Versuchs wird mit 6 N HCl gestoppt und wie beschrieben aufgearbeitet.

V. Zusammenfassung

Die Herkunft der C-Atome der Aminoäthylphosphonsäure (AEP) sollte durch Verfütterung von positionsmarkierter Glucose an intakte Zellen von Tetrahymena pyriformis geklärt werden.

Die Ausarbeitung der Versuchsbedingungen, der Methodik zur Isolierung und zum Abbau der AEP erfolgte mit Hilfe von ^{32}P-markiertem Phosphat, dessen Fütterung zur Synthese von ^{32}P-markierter AEP führt. Die nach der Säurehydrolyse der Tetrahymenazellen erhaltenen Aminophosphonsäuren werden durch Säulenchromatographie an Dowex-50 und Dowex-1 aufgetrennt und die AEP-Fraktionen nach Zugabe von Träger-AEP bis zur konstanten spezifischen Radioaktivität umkristallisiert. Die so erhaltene AEP wurde mit Ninhydrin und K-Dichromat in Essigsäure überführt, die nach dem Schmidt-Abbau in CO_2 und Methylamin zerlegt wurde.

Die Verfütterung positionsmarkierter Glucosen, ihr Einbau in AEP und deren Abbau zur Ermittlung der Radioaktivitätsverteilung lieferte ein eindeutiges Ergebnis. Nach Verfütterung von Glucose-1-^{14}C und Glucose-6-^{14}C ist die Radioaktivität zu 76 bzw. 80 % in der Methylgruppe, nach Verfütterung von Glucose-2-^{14}C dagegen zu 93 % in der Carboxylgruppe der aus AEP erhaltenen Essigsäure lokalisiert. Das C-1 der AEP entsteht demnach aus den C-Atomen 1 und 6, das C-2 aus dem C-2 der Glucose. Dieses Ergebnis steht mit der Annahme in Übereinstimmung, daß AEP durch Umlagerung aus einem C_3-Körper hervorgeht, der in der üblichen Weise aus dem glycolytischen Abbau der Glucose entsteht.

Für die Biosynthese von AEP sind zwei Wege möglich, die mit den vorliegenden Ergebnissen übereinstimmen:

1. Der Umlagerung von Phosphoenolpyruvat zu 2-Keto-3-Phosphono-Propionsäure, Transaminierung zu 2-Amino-3-Phosphono-Propionsäure und Decarboxylierung zu AEP.

2. Der Umlagerung von Phosphatidylserin bzw. Phosphatidyläthanolamin zu Lipid-gebundener APP bzw. AEP.

Eine Verfütterung von Serin und Äthanolamin an wachsende Kulturen von Tetrahymena führte zu keinem Einbau. Dagegen gelang es in einem zellfreien System Serin in AEP einzubauen.

Ein Syntheseschema wird diskutiert.

VI. Literaturverzeichnis

1. M. Horiguchi, M. Kandatsu; Nature 184, 901 (1959)
2. M. Kandatsu, M. Horiguchi; Agric. Biol. Chem. Tokyo 26, 721 (1962)
3. H. Rosenberg; Nature 203, 299 (1964)
4. J. S. Kittredge, R. R. Hughes; Biochemistry 3, 991 (1964)
5. J. S. Kittredge, E. Roberts, D. G. Simonsen; Biochemistry 1, 624 (1962)
6. G. Rouser, G. Kritchevsky, D. Heller, E. Lieber; J. Am. Oil Chemists' Soc. 40, 425 (1963)
7. L. D. Quin; Science 144, 1133 (1964)
8. T. Hori, O. Itasaka, H. Inoue, K. Yamada; J. Biochem. 56, 477 (1964)
9. A. J. De Koning; Nature 210, 113 (1966)
10. H. Shimizu, Y. Kakimoto, T. Nakajima, A. Kanazawa, I. Sano; Nature 207, 1197 (1965)
11. M. Kandatsu, M. Horiguchi; Agric. Biol. Chem. Tokyo 29, 781 (1965)
12. J. S. Kittredge, A. F. Isbell, R. R. Hughes; Biochemistry 6, 289 (1967)
13. J. Finkelstein; J. Amer. Chem. Soc. 68, 2397 (1946)
14. G. M. Kosolapoff; J. Amer. Chem. Soc. 69, 2112 (1947)
15. M. L. Hackspill; C. R. Acad. Sci. Paris 224, 406 (1947)
16. V. Chavane; Bull. Soc. Chim. France 774 (1948)
17. V. Chavane; Ann. Chim. 12, 4, 373 (1949)
18. M. I. Kabachnik, T. Ya. Medved; Izv. Akad. Nauk SSSR Otd. Khim. Nauk 635 (1950)
    M. I. Kabachnik, T. Ya. Medved; ibid. 95 (1951)
19. M. I. Kabachnik, T. Ya. Medved; Dokl. Akad. Nauk SSSR 83, 689 (1952)
    M. I. Kabachnik, T. Ya. Medved; Izv. Akad. Nauk SSSR Otd. Khim. Nauk 868 (1953)
    T. Ya. Medved, M. I. Kabachnik; ibid. 95 (1954)
20. M. E. Chalmers, G. M. Kosolapoff; J. Amer. Chem. Soc. 75, 5278 (1953)
21. J. R. Chambers, A. F. Isbell; J. Org. Chem. 29, 832 (1964)

22. I. V. Gupalov, Z. N. Gabitov; Materialy Nauchn. Konf. Vses. Obshchestva Gel'mintologov, Moscow, Sb 1963, Pt 1, 87 ctd. Chem. Abstr. 63, 8926G (1965)
23. N. N. Mel'nikov, A. F. Grapov, N. V. Lebedeva, L. A. Bakumenko, Z. V. Bukashkina; Byul. Izobret. i Tovarnykh Znakov 79 (1965) ctd. Chem. Abstr. 63, 7579G (1965)
24. G. O. Efimov, V. P. Lobov; Dopovidi Akad. Nauk Ukr. RSR 969 (1964)
25. S. C. Chou, O. H. Scherbaum; Exptl. Cell Res. 45, 31 (1966)
26. C. R. Liang, H. Rosenberg; Biochim. Biophys. Acta 125, 548 (1966)
27. R. G. Bridges, J. Ricketts; Nature 211, 199 (1966)
28. R. G. Bridges, J. Ricketts, J. T. Cox; J. Insect. Physiol. 11, 225 (1965)
29. R. G. Bridges, J. Ricketts; Biochem. J. 95, 41 P (1965)
30. M. Kandatsu, M. Horiguchi, M. Tamari; Agric. Biol. Chem. Tokyo 29, 779 (1965)
31. C. R. Liang, H. Rosenberg; in Vorbereitung
32. W. Segal; Nature 208, 1284 (1965)
33. V. Moses in H. Metzner,ed., "Die Zelle,Struktur und Funktion", Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft,Stuttgart (1966) p. 248
34. J. O. Corliss; J. Protozool. 1, 156 (1954)
35. W. I. Waithe; Exptl. Cell Res. 35, 100 (1964)
36. F. Cramer "Papierchromatographie" 4. Auflage, Verlag Chemie, Weinheim / Bergstraße (1958)
37. H. Rosenberg, J. M. La Nauce; Biochim. Biophys. Acta 141, 79 (1967)
38. J. Steffens; Dissertation, T. H. München (1961)
39. G. R. Seaman; Anat. Rec. 105, 522 (1949)
40. A. J. De Koning; Biochim. Biophys. Acta 130, 521 (1966)
41. S. Aronoff "Techniques of Radiobiochemistry" The Iowa State College Press, Ames, Iowa (1956)
42. G. O. Müller "Praktikum der quantitativen chemischen Analyse" 5. Auflage, S. Hirzel-Verlag, Leipzig (1959)
43. H. Remy "Lehrbuch der Anorganischen Chemie" Bd. I, 12. Auflage, Akademische Verlagsgesellschaft Geest & Portig KG., Leipzig (1965)

44. P. A. Kometiani in Proc. 5th Intern. Congr. Biochem. 7, 136 "Biosynthesis of Lipids" G. Popjak,ed., Pergamon Press (1963)
45. E. P. Kennedy; Federation Proc. 20, 934 (1961)
46. T. Chojnacki; Acta Biochim. Polon. 11, 11 (1964)
47. G. A. Bray; Anal. Biochem. 1, 279 (1960)
48. D. E. Nicholson; "Metabolic Pathways 1965", Koch-Light Laboratories Ltd, Colnbrook, Bucks, England
E. Marré, G. Forti, S. Cocucci, B. Elviri, G. Michal ; "Biochemical Pathways", C. F. Boehringer & Söhne, GmbH., Mannheim, Biochemical Division.

L e b e n s l a u f

Am 13. Oktober 1938 wurde ich als Sohn des kaufmännischen Angestellten Bernhard Geike und seiner Ehefrau Maria, geb. Schwarting, in Bremerhaven geboren. Nach vierjähriger Grundschule besuchte ich das Gymnasium (altsprachlicher Zweig) in Bremerhaven, wo ich im März 1959 das Abitur bestand.

Mit dem Sommer - Semester 1959 begann ich an der Universität Göttingen mein Studium mit der Fächerkombination Chemie, Biologie, Physik. Nach 10 - semestrigem Studium begann ich im April 1964 am Pflanzenphysiologischen Institut, Abteilung Biochemie der Pflanze, unter Anleitung von Herrn Prof. Trebst mit der Anfertigung einer Zulassungsarbeit zum Staatsexamen über das Thema: "Untersuchungen zur Stärkebiosynthese in isolierten Chloroplasten". Nach Fertigstellung dieser Arbeit entschloß ich mich zum Weiterstudium und zur Promotion. Da über die Biosynthese der Phosphonosäuren noch keine Arbeiten erschienen waren, wechselte ich auf Anraten von Herrn Prof. Dr. Trebst das Thema meiner Arbeit und widmete mich von Dezember 1965 bis April 1967 der Anfertigung vorliegender Arbeit.

Meinen akademischen Lehrern, den Professoren Ax, Birukow, Brockmann, Bückmann, Flammersfeld, Glemser, Heberer, Hilsch, Hirsch, Jost, Lüttke, Piepho, Pirson, Schneider und Trebst sowie Priv.-Doz. Dr. M. Ziegler bin ich zu großem Dank verpflichtet.